



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE GELES ELABORADOS  
A PARTIR DE EXTRACTOS ETANÓLICOS, ALCALOIDALES Y LIPÍDICOS DE  
DOS VARIEDADES DE CHOCHO (*Lupinus mutabilis* Sweet): 450 ANDINO Y  
CRIOLLO, SOBRE HERIDAS PRODUCIDAS EN RATONES”**

**TESIS DE GRADO**

**PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**

**BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**PRESENTADO POR:**

**SOFÍA LIZBETH CASTILLO MORENO**

**RIOBAMBA – ECUADOR**

**2014**

## **DEDICATORIA**

A mis padres Pepito y Michita, por apoyarme incondicionalmente y ser el pilar fundamental de mi vida. A mi hermana Karinita y cuñado Efraín por siempre escucharme y aconsejarme.

A mis abuelitos Jashito y Lucita porque desde pequeña siempre estuvieron junto a mí y gracias a Dios puedo seguir compartiendo con ellos gratos momentos.

A Santy por constantemente alentarme y formar parte muy importante de mi vida y a mi Mariita que con su inocencia y ternura transformaba mis momentos de agotamiento en felicidad.

Los amo mucho.

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios y a la Virgen María por bendecirme, protegerme y otorgarme sabiduría en cada momento de mi vida.

A mis padres por darme la vida, formarme como persona de bien y permitir mi formación profesional.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por conferir mi formación académica para llegar a ser una profesional de éxito.

Al Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias INIAP, por todas las facilidades brindadas.

A la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación SENESCYT, por el financiamiento para realizar esta investigación.

A mi tutor BQF. Diego Vinuesa, M.Sc. y colaboradora Dra. Susana Abdo quienes con sus conocimientos, experiencia, tiempo y dedicación me ayudaron a alcanzar mi objetivo profesional.

A la Dra. Lourdes Cuadrado por su apoyo vital en el desarrollo de esta investigación, gracias por compartir sus conocimientos, su paciencia y su tiempo.

Y a todos quienes de una u otra manera colaboraron para la culminación de esta investigación.

Yo, Sofía Lizbeth Castillo Moreno, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta tesis, y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

---

SOFÍA LIZBETH CASTILLO MORENO

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: **“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE GELES ELABORADOS A PARTIR DE EXTRACTOS ETANÓLICOS, ALCALOIDALES Y LIPÍDICOS DE DOS VARIEDADES DE CHOCHO (*Lupinus mutabilis Sweet*): 450 ANDINO Y CRIOLLO, SOBRE HERIDAS PRODUCIDAS EN RATONES”** de responsabilidad de la señorita egresada Sofía Lizbeth Castillo Moreno, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Ing. César Ávalos Infante  
**DECANO FACULTAD  
DE CIENCIAS**

-----

-----

Dra. Ana Karina Albuja  
**DIRECTORA ESCUELA  
DE BIOQUÍMICA Y  
FARMACIA**

-----

-----

BQF. Diego Vinueza M.Sc  
**DIRECTOR DE TESIS**

-----

-----

Dra. Susana Abdo  
**MIEMBRO DE TRIBUNAL**

-----

-----

**COORDINADOR  
SISBIB - ESPOCH**

-----

-----

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE GRÁFICOS

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

ÍNDICE DE ANEXOS

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

SUMMARY

INTRODUCCIÓN

JUSTIFICACIÓN

### CAPITULO I

1.	MARCO TEORICO	1
1.1.	Cicatrización	1
1.1.1	Lesiones Primarias	1
1.1.2.	Lesiones Secundarias	1
1.1.3	Fase inflamatoria o de retraso inicial	1
1.1.4	Fase Proliferativa	1
1.1.5	Fase de Maduración y Remodelación	2
1.2	FÁRMACO CICATRIZANTE EN EL ECUADOR: TROLAMINA	2
1.2.1	Indicaciones	3
1.2.2	Reacciones adversas	3
1.3	FITOTERAPIA	3
1.4	EL CHOCHO ( <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> )	4
1.4.1	Descripción	4
1.4.2	Taxonomía	5
1.4.3	Propiedades nutricionales	5
1.4.4.	Ácidos Grasos	7
1.4.5	Propiedades Medicinales	8

1.4.6	Papel en los vegetales	8
1.4.7	Principales Metabolitos Secundarios	8
1.4.8	Flavonoides	9
1.4.9	Fitoesteroles	9
1.4.10.	Tocoferoles	9
1.4.11	Taninos	10
1.5.	ALCALOIDES	10
1.5.1	Características de los Alcaloides	10
1.6	ALCALOIDES QUINOLIZIDÍNICOS	11
1.6.1	Alcaloides del Chocho	12
1.6.1.1.	Acción farmacológica: Lupanina y Esparteína	12
1.6.2	Propiedades físico-químicas de los alcaloides del chocho	13
1.6.3	Toxicidad de los alcaloides del chocho	13
1.6.4	Identificación de los alcaloides	13
1.7	GELES	14
1.8	DOSIS LETAL 50 (DL50)	14
	CAPITULO II	
2.	PARTE EXPERIMENTAL	16
2.1	LUGAR DE INVESTIGACIÓN	16
2.2	MATERIALES Y REACTIVOS	16
2.2.1	Material Vegetal	16
2.2.2	Material del Laboratorio	16
2.2.3	Reactivos	17
2.3	Equipos	18
2.4	Técnicas y Métodos	19
2.4.1.	OBTENCION DE LOS EXTRACTOS ETANOLICOS, ALCALOIDES Y LIPIDICOS DE DOS VARIEDADES DE CHOCHO ( <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> ), 450 ANDINO CRIOLLO	19
2.4.1.1	Obtención de los extractos etanólicos	19
2.4.1.2	Obtención de extractos alcaloidales	20
2.4.1.3	Obtención de los extractos lipídicos	20
2.4.2.	IDENTIFICACION DE LOS GRUPOS QUIMICOS PRESENTES EN CADA EXTRACTO, MEDIANTE EL TAMIZAJE	21

	FITOQUIMICO	
2.4.3.	DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS ETANOLICOS, ALCALOIDES Y LIPIDICOS DE DOS VARIEDADES DE CHOCHO ( <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet):450 ANDINO Y CRIOLLO.	21
2.4.3.1.	BIOENSAYO DE TOXICIDAD DEL CHOCHO 450 Y CHOCHO CRIOLLO EN <i>Artemia salina</i>	21
2.4.3.2.	DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL 50 <sub>(DL50)</sub> DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS, ALCALOIDALES Y LIPÍDICOS DEL CHOCHO 450 Y CHOCHO CRIOLLO EN RATONES ( <i>Mus musculus</i> )	22
2.4.3.2.1.	Determinación de la DL50 de los extractos etanólicos del chocho 450 y chocho criollo	23
2.4.3.2.2	Determinación de la DL50 de los extractos alcaloidales del chocho 450 y chocho criollo	25
2.4.3.2.3	Determinación de la DL50 de los extractos lipídicos del chocho 450 y chocho criollo	27
2.4.3.3.	ENSAYO DE IRRITABILIDAD DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS, ALCALOIDALES Y LIPÍDICOS DEL CHOCHO 450 Y CHOCHO CRIOLLO	29
2.4.4.	ELABORACIÓN DE GELES DE LAS DOS VARIEDADES DE <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet Y CONTROL DE CALIDAD DE LOS MISMO	30
2.4.4.1.	FORMULACIÓN DE LOS GELES	30
2.4.4.1.1.	Formulación del Gel con Extracto Etanólico	30
2.4.4.1.2.	Formulación del Gel con Extracto Alcaloidal	31
2.4.4.1.3.	Formulación del Gel con Extracto Lipídico	31
2.4.4.2	CONTROL DE CALIDAD DE LOS GELES	32
2.4.4.2.1	Agua purificada	32
2.4.4.2.2.	Carbopol	33
2.4.4.2.3	Croduret	33
2.4.4.2.4.	Dimeticona	34
2.4.4.2.5	Glicerina	34



2.4.4.2.6	Goma Xanthan	35
2.4.4.2.7	Metil parabeno sódico	36
2.4.4.2.8	Propil parabeno sódico	36
2.4.4.2.9	Trietanolamina (TEA)	37
2.4.4.2.10	Tween 80	37
2.4.4.2.11	Control de características Organolépticas y Físicas de los Geles.	38
2.4.4.2.12	Control Microbiológico de los Geles: Determinación de aerobios mesófilos, coliformes, mohos y levaduras en placas Petrifilm.	38
2.4.5.	COMPROBACIÓN DE LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS, ALCALOIDALES Y LIPÍDICOS DE DOS VARIEDADES DE CHOCHO ( <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> ) SOBRE HERIDAS PRODUCIDAS EN RATONES	39
2.4.5.1	Población de estudio	39
2.4.5.2	Evaluación actividad cicatrizante	40
	CAPÍTULO III	
3.	RESULTADOS Y DISCUSION	42
3.1.	OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS, ALCALOIDALES Y LIPÍDICOS DE DOS VARIEDADES DE CHOCHO ( <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> ): 450 ANDINO Y CRIOLLO	42
3.2.	IDENTIFICACIÓN DE LOS GRUPOS QUÍMICOS PRESENTES EN CADA EXTRACTO, MEDIANTE EL TAMIZAJE FITOQUÍMICO	42
3.3.	DETERMINACION DE TOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS, ALCALOIDALES Y LIPÍDICOS DE DOS VARIEDADES DE CHOCHO ( <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> ): 450 ANDINO Y CRIOLLO.	44
3.3.1.	BIOENSAYO DE TOXICIDAD DEL CHOCHO 450 Y CHOCHO CRIOLLO EN <i>Artemia salina</i>	44
3.3.2.	DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL 50 <sub>(DL50)</sub> DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS, ALCALOIDALES Y LIPÍDICOS DEL CHOCHO 450 Y CHOCHO CRIOLLO EN RATONES	48
3.3.2.1.	Determinación De La Dosis Letal 50 <sub>(DL50)</sub> De Los Extractos Etanólicos Del Chocho 450 Y Chocho Criollo	48

3.3.2.2.	Determinación De La Dosis Letal 50 <sub>(DL50)</sub> De Los Extractos Alcaloidales Del Chocho 450 Y Chocho Criollo	50
3.3.2.3.	Determinación De La Dosis Letal 50 <sub>(DL50)</sub> De Los Extractos Lipídicos Del Chocho 450 Y Chocho Criollo	53
3.3.3.	ENSAYO DE IRRITABILIDAD DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS, ALCALOIDALES Y LIPÍDICOS DEL CHOCHO 450 Y CHOCHO CRIOLLO	55
3.4.	ELABORACIÓN DE GELES DE LAS DOS VARIEDADES DE <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet Y CONTROL DE CALIDAD DE LOS MISMOS	55
3.4.1.	Gel con extracto etanólico de Chocho 450 y Criollo al 2 y 1 %	55
3.4.2.	Gel con extracto alcaloidal de Chocho 450 y Criollo al 2 y 1 %	56
3.4.3.	Gel con extracto lipídico de Chocho 450 y Criollo al 2% y 1 %	57
3.5.	CONTROL DE CALIDAD DE LOS GELES	57
3.5.1.	Control de calidad de los excipientes	57
3.5.2.	Control de características Organolépticas y Físicas de los Geles	63
3.5.3.	Control Microbiológico de los Geles: Determinación de aerobios mesófilos, coliformes, mohos y levaduras en placas Petrifilm	64
3.6.	COMPROBACIÓN DE LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS, ALCALOIDALES Y LIPÍDICOS DE DOS VARIEDADES DE CHOCHO ( <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet) SOBRE HERIDAS PRODUCIDAS EN RATONES.	66
3.6.1	Evaluación Actividad Cicatrizante	66
3.6.2	Evaluación Histopatológica	84
	CONCLUSIONES	87
	RECOMENDACIONES	88
	BIBLIOGRAFÍA	89
	ANEXOS	96

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>°T</b>	Temperatura
<b>μL</b>	Microlitro
<b>Cm</b>	Centímetros
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>g</b>	Gramos
<b>h</b>	Horas
<b>kg</b>	Kilogramo
<b>mg</b>	Miligramo
<b>Min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>pH</b>	Potencial de Hidrógeno
<b>Rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>TEA</b>	Trietanolamina
<b>UV</b>	Ultravioleta

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>CUADRO 1.</b>	Análisis bromatológico del chocho amargo y desamargado	6
<b>CUADRO 2.</b>	Perfil de ácidos grasos del Aceite de Oliva y del Aceite de Chocho	7
<b>CUADRO 3.</b>	Mililitros administrados en la DL50 del extracto etanólico del chocho 450	23
<b>CUADRO 4.</b>	Mililitros administrados en la DL50 del extracto etanólico del chocho Criollo	24
<b>CUADRO 5.</b>	Pautas de Observación	25
<b>CUADRO 6.</b>	Mililitros administrados en la DL50 del extracto alcaloidal del chocho 450	26
<b>CUADRO 7.</b>	Mililitros administrados en la DL50 del extracto alcaloidal del chocho Criollo	26
<b>CUADRO 8.</b>	Mililitros administrados en la DL50 del extracto lipídico del chocho 450	28
<b>CUADRO 9.</b>	Mililitros administrados en la DL50 del extracto lipídico del chocho Criollo	28
<b>CUADRO 10.</b>	Resultados del Tamizaje Fitoquímico	43
<b>CUADRO 11</b>	CL50 del Extracto etanólico de chocho 450	44
<b>CUADRO 12</b>	Clasificación toxicidad según CYTED	45
<b>CUADRO 13</b>	CL50 del Extracto etanólico de chocho Criollo	45

<b>CUADRO 14</b>	CL50 del Extracto alcaloidal de chocho 450	46
<b>CUADRO 15</b>	CL50 del Extracto alcaloidal de chocho Criollo	46
<b>CUADRO 16</b>	CL50 del Extracto lipídico de chocho 450	47
<b>CUADRO 17</b>	CL50 del Extracto lipídico de chocho Criollo	47
<b>CUADRO 18.</b>	Evaluación de la Toxicidad Aguda de los extractos etanólicos del chocho 450 y chocho criollo	48
<b>CUADRO 19.</b>	Comparación de los órganos de los grupos con tratamiento y los órganos del blanco, de los extractos etanólicos del chocho 450 y chocho criollo	49
<b>CUADRO 20.</b>	Criterio de Williams, 1985	50
<b>CUADRO 21.</b>	Evaluación de la Toxicidad Aguda de los extractos alcaloidales del chocho 450 y chocho criollo	50
<b>CUADRO 22</b>	Comparación de los órganos de los grupos con tratamiento y los órganos del blanco, de los extractos alcaloidales del chocho 450 y chocho criollo	52
<b>CUADRO 23.</b>	Evaluación de la Toxicidad Aguda de los extractos lipídicos del chocho 450 y chocho criollo	53
<b>CUADRO 24.</b>	Comparación de los órganos de los grupos con tratamiento y los órganos del blanco, de los extractos lipídicos del chocho 450 y chocho criollo	54
<b>CUADRO 25.</b>	Agua Purificada	58
<b>CUADRO 26.</b>	Carbopol	58

<b>CUADRO 27.</b>	Croduret	59
<b>CUADRO 28.</b>	Dimeticona	59
<b>CUADRO 29.</b>	Glicerina	60
<b>CUADRO 30.</b>	Goma Xanthan	60
<b>CUADRO 31.</b>	Metil parabeno sódico	61
<b>CUADRO 32.</b>	Propil parabeno sódico	61
<b>CUADRO 33.</b>	Trietanolamina (TEA)	62
<b>CUADRO 34.</b>	Tween 80	62
<b>CUADRO 35</b>	Características Organolépticas y Físicas de los Geles con extractos etanólicos, alcaloidales y lipídicos al 2% y 1	63
<b>CUADRO 36</b>	Control Microbiológico de los Geles con extractos etanólicos, alcaloidales y lipídicos al 2% y 1%	65
<b>CUADRO 37</b>	ANÁLISIS ESTADÍSTICO ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICO, LIPÍDICO Y ALCALOIDAL DEL CHOCHO 450 Y CRIOLLO ( <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> ); DESPUES DE TRES DÍAS DE SU ADMINISTRACIÓN. ANOVA UN FACTOR COMPARACIONES MÚLTIPLES. MÉTODO: TUKEY HSD AL 95.00 %.	66
<b>CUADRO 38</b>	ANÁLISIS ESTADÍSTICO ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICO, LIPÍDICO Y ALCALOIDAL DEL CHOCHO 450 Y CRIOLLO ( <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> ); DESPUES DE CINCO DÍAS DE SU ADMINISTRACIÓN. ANOVA UN FACTOR	69

COMPARACIONES MÚLTIPLES. MÉTODO: TUKEY HSD AL 95.00 %.

**CUADRO 39** ANÁLISIS ESTADÍSTICO ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE LOS 71  
EXTRACTOS ETANÓLICO, LIPÍDICO Y ALCALOIDAL DEL  
CHOCHO 450 Y CRIOLLO ((*Lupinus mutabilis Sweet*); DESPUES  
DE OCHO DÍAS DE SU ADMINISTRACIÓN. ANOVA UN FACTOR  
COMPARACIONES MÚLTIPLES. MÉTODO: TUKEY HSD AL  
95.00 %.

**CUADRO 40** ANÁLISIS ESTADÍSTICO ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE LOS 74  
EXTRACTOS ETANÓLICO, LIPÍDICO Y ALCALOIDAL DEL  
CHOCHO 450 Y CRIOLLO (*Lupinus mutabilis Sweet*); DESPUES  
DE ONCE DÍAS DE SU ADMINISTRACIÓN. ANOVA UN FACTOR  
COMPARACIONES MÚLTIPLES. MÉTODO: TUKEY HSD AL  
95.00 %.

**CUADRO 41** ANÁLISIS ESTADÍSTICO ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE LOS 76  
EXTRACTOS ETANÓLICO, LIPÍDICO Y ALCALOIDAL DEL  
CHOCHO 450 Y CRIOLLO (*Lupinus mutabilis Sweet*); DESPUES  
DE CATORCE DÍAS DE SU ADMINISTRACIÓN. ANOVA UN  
FACTOR COMPARACIONES MÚLTIPLES. MÉTODO: TUKEY  
HSD AL 95.00 %.

**CUADRO 42** ANÁLISIS ESTADÍSTICO TIEMPO DE CICATRIZACIÓN (DÍAS) 79  
DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICO, LIPÍDICO Y ALCALOIDAL  
DEL CHOCHO 450 Y CRIOLLO (*Lupinus mutabilis Sweet*). ANOVA  
UN FACTOR COMPARACIONES MÚLTIPLES. MÉTODO: TUKEY  
HSD AL 95.00 %.

**CUADRO 43** Área bajo la curva de la superficie no cicatrizada a término del 81  
periodo de estudio

**CUADRO 44** Anova de un factor

<b>CUADRO 45</b>	Análisis mediante Dunnet	83
<b>CUADRO 46</b>	Evaluación Histopatológica de las muestras de los tejidos epiteliales de ratones ( <i>Mus musculus</i> ), a los 14 días del análisis	85
<b>CUADRO 47</b>	Evaluación Histopatológica de las muestras de los tejidos epiteliales de ratones ( <i>Mus musculus</i> ), a los 21 días del análisis	85



## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>GRÁFICO 1.</b>	Esquema de la Cicatrización	2
<b>GRÁFICO 2.</b>	Presentación del fármaco. Nombre comercial (Biafine)	3
<b>GRÁFICO 3</b>	Planta y granos de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i>	4
<b>GRÁFICO 4.</b>	Estructura química de la Quinolizidina	12
<b>GRÁFICO 5.</b>	Estructura química de la Lupanina y Esparteína	12
<b>GRÁFICO 6.</b>	CAJAS DE MEDIAS Y DESVIACIÓN DE ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICO, LIPÍDICO Y ALCALOIDAL DEL CHOCHO 450 Y CRIOLLO ( <i>LUPINUS MUTABILIS SWEET</i> ); DESPUES DE TRES DÍAS DE SU ADMINISTRACIÓN	68
<b>GRÁFICO 7.</b>	CAJAS DE MEDIAS Y DESVIACIÓN DE ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICO, LIPÍDICO Y ALCALOIDAL DEL CHOCHO 450 Y CRIOLLO ( <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> ); DESPUES DE CINCO DÍAS DE SU ADMINISTRACIÓN	70
<b>GRÁFICO 8</b>	CAJAS DE MEDIAS Y DESVIACIÓN DE ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICO, LIPÍDICO Y ALCALOIDAL DEL CHOCHO 450 Y CRIOLLO ( <i>Lupinus mutabilis sweet</i> ); DESPUES DE OCHO DÍAS DE SU ADMINISTRACIÓN	72
<b>GRÁFICO 9.</b>	CAJAS DE MEDIAS Y DESVIACIÓN DE ACTIVIDAD	75

CICATRIZANTE DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICO, LIPÍDICO Y ALCALOIDAL DEL CHOCHO 450 Y CRIOLLO (*Lupinus mutabilis sweet*); DESPUES DE ONCE DÍAS DE SU ADMINISTRACIÓN

**GRÁFICO 10.** CAJAS DE MEDIAS Y DESVIACIÓN DE ACTIVIDAD 78  
CICATRIZANTE DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICO, LIPÍDICO Y ALCALOIDAL DEL CHOCHO 450 Y CRIOLLO (*Lupinus mutabilis Sweet*); DESPUES DE CATORCE DÍAS DE SU ADMINISTRACIÓN

**GRÁFICO 11.** CAJAS DE MEDIAS Y DESVIACIÓN DE ACTIVIDAD 80  
CICATRIZANTE DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICO, LIPÍDICO Y ALCALOIDAL DEL CHOCHO 450 Y CRIOLLO (*Lupinus mutabilis sweet*); DESPUES DE CATORCE DÍAS DE SU ADMINISTRACIÓN

**GRÁFICO 12** DÍAS DE CICATRIZACIÓN 81

**GRÁFICO 13** Índice de Cicatrización 84

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

<b>FOTOGRAFÍA 1.</b>	Materia prima (Chocho 450 y chocho Criollo)	104
<b>FOTOGRAFÍA 2.</b>	Maceración de los extractos	104
<b>FOTOGRAFÍA 3.</b>	Filtración y concentración de los Extractos	104
<b>FOTOGRAFÍA 4.</b>	Extractos etanólicos, alcaloidales y lipídicos de las dos variedades de chocho ( <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet): 450 Andino y Criollo	105
<b>FOTOGRAFÍA 5.</b>	Tamizaje Fitoquímico	105
<b>FOTOGRAFÍA 6.</b>	Disección de vísceras de ratones, aplicados extractos etanólicos, alcaloides y lipídicos de las dos variedades de chocho	107
<b>FOTOGRAFÍA 7.</b>	Cicatrización de las heridas	108

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO 1.</b>	Bioensayo de Toxicidad del Chocho 450 y Chocho Criollo en <i>Artemia salina</i> .	96
<b>ANEXO 2.</b>	Determinación de la Dosis Letal 50 <sub>(DL50)</sub> de los extractos etanólicos, alcaloidales y lipídicos del Chocho 450 y Chocho criollo.	97
<b>ANEXO 3.</b>	Disección y comparación de los órganos de los grupos con tratamiento y los órganos del Blanco.	98
<b>ANEXO 4.</b>	Ensayo de irritabilidad de los extractos etanólicos, alcaloidales y lipídicos del Chocho 450 y Chocho criollo.	99
<b>ANEXO 5.</b>	Elaboración de geles con extractos etanólicos, alcaloidales y lipídicos de Chocho 450 y Chocho Criollo	100
<b>ANEXO 6.</b>	Control de calidad de geles: Características Organolépticas y Físicas de los Geles	101
<b>ANEXO 7.</b>	Control Microbiológico de los Geles: Determinación de aerobios mesófilos, coliformes, mohos y levaduras en placas Petrifilm	102
<b>ANEXO 8.</b>	Administración Vía Tópica de los Geles y Medición De las Heridas	103
<b>ANEXO 9.</b>	EVIDENCIA FOTOGRAFÍAS.	104

## RESUMEN

La investigación fue realizada en los laboratorios de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, en el Departamento de Nutrición y Calidad del INIAP, en los laboratorios de la Facultad de Ciencias de la Salud de la UNACH y financiada por el SENESCYT e INIAP; con el objetivo de comprobar la actividad cicatrizante de geles elaborados con extractos etanólicos, alcaloidales y lipídicos de dos variedades de Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet): 450 Andino y Criollo. De esta manera, se pretende generar una alternativa frente a los fármacos cicatrizantes, con un producto natural que sea más económico.

Mediante los métodos de maceración, extracción con Soxhlet, decocción del grano de chocho, se obtuvieron los extractos etanólicos, lipídicos y alcaloidales de las dos variedades de chocho. Se identificaron cualitativamente los metabolitos secundarios de mayor importancia y se procedió a elaborar los geles bajo especificaciones y estándares de calidad.

La metodología experimental, se basó en el empleo de animales de experimentación 45 ratones (*Mus musculus*) y los tratamientos empleados fueron geles con los extractos etanólicos, alcaloidales y lipídicos obtenidos a las concentraciones de 2% y 1%. La herida fue inducida en el dorso de cada ratón, con un diámetro de 0.9 cm<sup>2</sup>. Los geles fueron administrados vía tópica b.i.d. durante 14 días; en este tiempo se midió la contracción de la herida hasta su cicatrización.

Con los resultados obtenidos se realizó ANOVA de un factor y un post test TUKEY HSD al 95%, evidenciándose que el GEL CICATRIZANTE CON EXTRACTO ALCALOIDAL DE CHOCHO CRIOLLO AL 1%, posee actividad cicatrizante con una medida de la herida de 0.1000 cm<sup>2</sup>, comparado con la medida del control positivo Trolamina igual a 0.1567 cm<sup>2</sup>. Por lo que se recomienda continuar el estudio experimental pre clínico realizado y proceder a realizar el estudio clínico en personas con distintos tipos de heridas; para que este nuevo gel cicatrizante pueda ser manufacturado a nivel de la industria farmacéutica.

## SUMMARY

The research was conducted in the laboratories of the Faculty of Sciences ESPOCH, Department of Nutrition and Quality INIAP, in the laboratories of the Faculty of Health Sciences UNACH and was funded by the SENESCYT and INIAP; in order to check the healing activity gels prepared with ethanolic, alcaloidales and lipid extracts, of the two varieties Chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*): Criollo and 450 Andino. Thus, it is intended to generate an alternative to healing drugs, with a natural product that is cheaper.

By the methods of maceration, Soxhlet extraction, decoction lupine grain, obtained the ethanol, lipid and alcaloidales extracts of the two varieties of lupine extracts. Secondary metabolites major qualitatively identified and proceeded to prepare the gels to specifications and quality standards.

The experimental methodology is based on the use of experimental animals 45 mice (*Mus musculus*) and the treatments used were gels with ethanolic lipid extracts obtained alcaloidales and concentrations of 2% and 1%. The wound was induced on the back of each mouse, with a diameter of 0.9 cm<sup>2</sup>. The gels were administered topically bid for 14 days; at this time the wound contraction was measured until healing.

With the results-way ANOVA was performed and a post TUKEY HSD test at 95%, showing that the GEL alkaloidal HEALING EXTRACT OF THE CHOCHO CRIOLLO 1%, has healing activity with a measure of the wound 0.1000 cm<sup>2</sup>, compared with as positive control the Trolamine equal to 0.1567 cm<sup>2</sup>. So it is recommended to continue the pre clinical pilot study done and proceed with the trial in people with different types of wounds; for this new scar gel can be manufactured at the level of the pharmaceutical industry.

## INTRODUCCIÓN

Desde tiempos remotos de la humanidad, las plantas han sido un recurso promisorio tanto para su alimentación como para la prevención y tratamiento de dolencias. Las plantas medicinales se las utiliza como base fundamental de la medicina popular de diversos países.

Proviene de una tradición, que por siglos ha mostrado la eficacia de varias plantas aplicadas en forma empírica; pero que no habían sido sometidos a estudios científicos que determinarían los componentes químicos a los que se debe sus propiedades farmacológicas (Rodríguez & González, 2001).

El uso de plantas medicinales es una práctica común alrededor del mundo; de acuerdo a la Organización Mundial de Salud (OMS), el 80 % de la población de los países en desarrollo requieren de éstas para satisfacer o complementar sus necesidades médicas (Muñoz, 1996).

El Ecuador forma parte de los 17 países más biodiversos en cuanto a flora, cuenta con más de 16000 especies de plantas, de las cuales 5172 son útiles y de estas 3118 son usadas con fines medicinales, lo extraordinario es que el 75% de las especies medicinales son plantas nativas (Rodríguez & González, 2001).

Bajo este contexto; el chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) una leguminosa nativa de los países Andinos. El mismo que a más de poseer numerosas propiedades nutricionales posee propiedades medicinales. Por ejemplo según estudios científicos realizados ya ha sido demostrado su actividad antimicrobiana, antifúngica, hipoglicemiante, antiséptica, repelente, antiinflamatoria y gracias a la esparteína propiedades tónico cardíacas, antiespasmódicas y sedantes (Cayturo, 2012).

## JUSTIFICACIÓN

En Ecuador, la población pobre representa el 36,77 % del total de la población (SIISE, 2012), con un ingreso mensual de \$ 77,04 por persona (equivale a \$ 2.57 diarios) (INEC, 2012). Esta realidad, muestra la incapacidad de la población pobre ecuatoriana por cubrir las necesidades básicas, entre ellas la salud. En consecuencia, es prácticamente imposible adquirir medicamentos costosos, por lo que tienden a suplirlos con otras alternativas; tales como la utilización de plantas medicinales y tratamientos naturales (Rodríguez & González, 2001).

Todos hemos sufrido alguna vez una herida por caídas, traumatismos, intervenciones quirúrgicas; y la mayoría de las veces los mecanismos de regeneración de nuestra piel han sido suficientes para conseguir la cicatrización total de la lesión, pero a veces se pueden producir alteraciones en este proceso. Por lo que para lograr un proceso exitoso de cicatrización de las heridas, se necesita de fármacos cicatrizantes (Bielsa, 2006).

En la actualidad en el Ecuador, la Trolamina (BIAFINE®) es el único fármaco empleado como cicatrizante (Cuadro Nacional de Medicamentos Básicos (CNMB)). Este medicamento no es tan recomendable por su alto costo, sus indicaciones y sus posibles efectos adversos (prurito e irritación en dermatosis alérgicas). Es más, solo se aplica a diversos tipos de lesiones cutáneas siempre que la piel no presente lesiones y las heridas no estén infectadas (MSP, 2013).

En consecuencia, es necesario emplear el cicatrizante junto con antibióticos y antiinflamatorios para tratar procesos diferentes: las infecciones y la cicatrización. Por tanto, los costes se incrementan y se convierten en tratamientos inaccesibles para las personas de escasos recursos económicos (Rodríguez & González, 2001).

Es por esta última razón, por lo que se propone encontrar tratamientos más económicos. Para ello, se pretende generar geles cicatrizantes hechos a base de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) que aparte de ser un tratamiento natural será de bajo costo, accesible al bolsillo de todos.



El chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) es una leguminosa nativa de los países Andinos tales como Bolivia, Perú, Colombia, Chile y Ecuador (INIAP, 2011). El cual no solo posee excelentes propiedades nutritivas por su alto contenido de proteínas y calcio (FAO, 1988); sino también es apreciado por su uso medicinal.

Sus propiedades farmacológicas son debidas al alto contenido de alcaloides, flavonoides, tocoferoles, ácidos grasos esenciales y en menor cantidad taninos y vitamina C. Los flavonoides protegen los vasos sanguíneos, favorecen la síntesis de colágeno y estimulan el sistema inmunológico (Cañigueral, 2003). Los tocoferoles actúan como antioxidantes y favorecen el proceso de cicatrización. (Domínguez, 2003). Los taninos tienen propiedades vasoconstrictoras, astringentes, antisépticas y cicatrizantes (Bruneton, Jean, 2001); mientras que la vitamina C mejora la cicatrización de las heridas (Falabella, 2002).

Con los antecedentes presentados se plantearon los siguientes objetivos en la investigación

Como objetivo general Evaluar la actividad cicatrizante de geles elaborados a partir de extractos etanólicos, alcaloidales y lipídicos de dos variedades de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet): 450 Andino y criollo, sobre heridas producidas en ratones. Para esto se obtuvo extractos etanólicos, alcaloidales y lipídicos de dos variedades de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet): 450 Andino y criollo. Se identificó los compuestos químicos presentes en cada extracto, mediante el tamizaje Fitoquímico. Se elaboró geles de las dos variedades de *Lupinus mutabilis* Sweet, se realizó el control de calidad de los mismos y se comprobó la actividad cicatrizante de los extractos etanólicos, alcaloidales y lipídicos de dos variedades de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) sobre heridas producidas en ratones.

## **CAPITULO I**

### **1. MARCO TEORICO**

#### **1.1. CICATRIZACIÓN**

La cicatrización o curación de las heridas es un proceso biológico que tiene como objetivo la restauración de los tejidos que han sufrido una herida (Wolf, 2009).

Tipos de lesiones dermatológicas:

##### **1.1.1. Lesiones Primarias**

Son aquellas que se desarrollan como resultado directo del proceso de enfermedad y se consideran entre ellas: mácula, pápula, nódulo, pústula, vesícula (Casanova, J.; Ribera, M., 2000).

##### **1.1.2. Lesiones Secundarias**

Son aquellas que evolucionan de las lesiones primarias o bien se desarrollan como consecuencia de alguna acción externa y son: costra, cicatriz, úlcera, excoriación y fisura (Casanova, J.; Ribera, M., 2000)

Fases de la cicatrización de las heridas:

##### **1.1.3. Fase inflamatoria o de retraso inicial**

Período que dura entre 1 día y 5 días. Inicia con la formación del coágulo y la agregación plaquetaria para ayudar a controlar la hemorragia. Luego se da vasodilatación y presencia de leucocitos como respuesta a la inflamación (Bielsa, 2006).

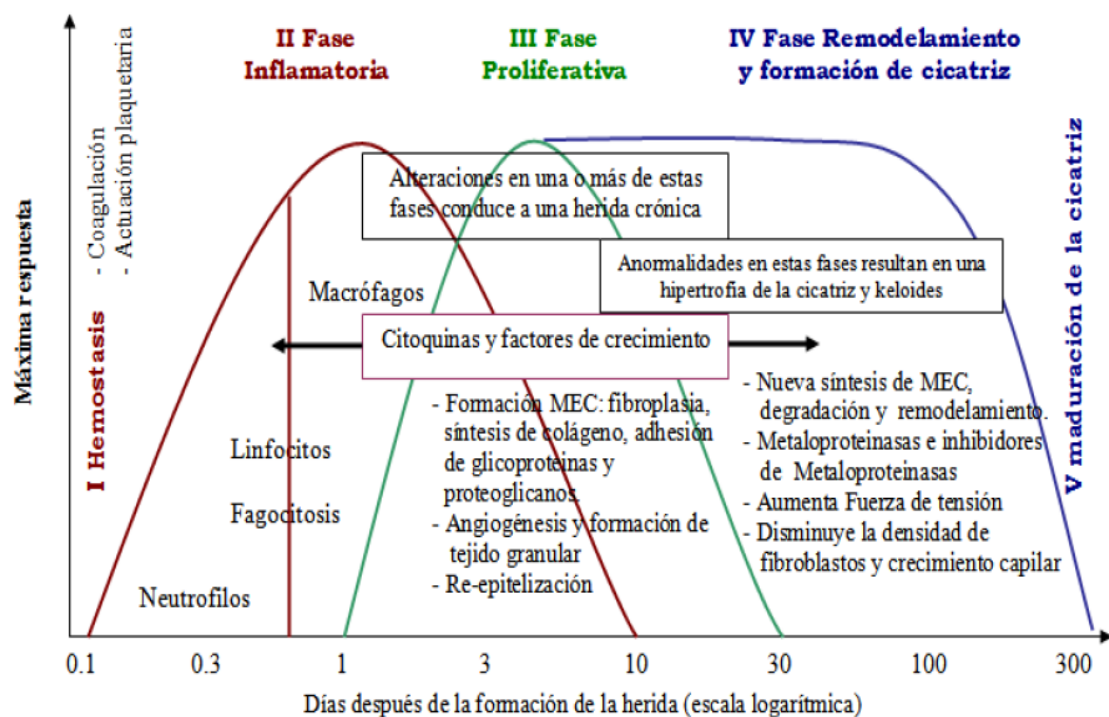
##### **1.1.4. Fase Proliferativa**

Su duración oscila entre 4 y 14 días. En esta fase se da la formación de nuevos capilares y la proliferación de fibroblastos y colágeno. La epidermis recupera su grosor y aumenta su resistencia (Bielsa, 2006).

### 1.1.5. Fase de Maduración y Remodelación

Su duración es variable, depende del tipo de herida y varía de semanas a meses. En esta fase se da la regeneración de las fibras de colágeno, y se congregan desarrollando mayor resistencia. En una herida, la maduración normal primero presenta una cicatriz inmadura roja, dura y elevada para luego convertirse en una cicatriz madura pálida, blanda y plana (Bielsa, 2006).

**GRÁFICO 1:** Esquema de la Cicatrización



MEC: Matriz extracelular

FUENTE: BIELSA, 2011

## 1.2. FÁRMACO CICATRIZANTE EN EL ECUADOR: TROLAMINA

Cicatrizante usado para el tratamiento tópico de lesiones inflamatorias de la piel causadas por agentes físicos.

**GRÁFICO 2:** Presentación del fármaco. Nombre comercial (Biafine®)



FUENTE: AVIBON, 2013

### **1.2.1. Indicaciones**

La Trolamina es usada para el tratamiento de:

- Quemaduras cutáneas (especialmente por radioterapia)
- Eritemas
- Úlceras, y
- Otras heridas cutáneas no infectadas.

### **1.2.2. Reacciones adversas**

Enrojecimiento de la piel en el área aplicado y prurito (MSP, 2014).

## **1.3. FITOTERAPIA**

La Fitoterapia estudia la utilización de las plantas medicinales y sus derivados con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, para aliviar o para curar las enfermedades (Pamplona, 2006). Este es el caso del chocho una planta nativa del Ecuador, la cual comprobada científicamente aparte de poseer numerosas propiedades nutricionales, posee también propiedades medicinales (Cayturo, 2012).

#### 1.4.EL CHOCHO (*Lupinus mutabilis* Sweet)

**GRAFICO 3: Planta y granos de *Lupinus mutabilis* Sweet**



FUENTE: INIAP, 2013

##### **1.4.1. Descripción**

El chocho es una planta bianual leguminosa propia de los Andes, principalmente de Bolivia, Perú y Ecuador. Llega a medir hasta dos metros de altura. Crece en altitudes de 2.000 a 3.800 m.s.n.m. Sus ramificaciones pueden ser de escasas a abundantes, cada ramificación presenta flores(FAO, 1988)..

La tonalidad de la flor varía desde de un azul claro hasta uno muy intenso (puede llegar a púrpura). Este cambio se da a partir del inicio de la formación hasta su maduración y de allí se origina su nombre científico, mutabilis, es decir que cambia (FAO, 1988).

Las semillas de chocho se encuentran en una vaina, de 3 a 8 granos; varían de forma ovalada a redonda y los colores incluyen crema, blanco, marrón, amarillo, gris (Caicedo & Peralta, 2000).

Puede presentar gran variabilidad de adaptación ecológica y morfológica; se cultiva en áreas moderadamente frías, se adapta a lugares rústicos, secos y es capaz de fijar nitrógeno (Caicedo & Peralta, 2000).

El cultivo de chocho se localiza en la región Sierra, en las provincias de Tungurahua, Pichincha, Bolívar, Carchi, Imbabura, Cotopaxi y Chimborazo. Siendo estas dos últimas las provincias con mayor superficie de cosecha. La variedad más consumida y más abundante en Ecuador es el Chocho INIAP 450 Andino. (El Agro, 2012)

#### **1.4.2. Taxonomía**

Su nombre científico es *Lupinus mutabilis* Sweet pertenece a la familia Leguminosidae y sus nombres comunes son “tauri” (Bolivia), “tarwi” (Perú) y “chocho” en Ecuador (Delgado, 2010).

#### **1.4.3. Propiedades nutricionales**

El chocho es considerado como un superalimento debido a su alto porcentaje de proteína (41 al 52%), el mismo que tranquilamente podría reemplazar a la leche y a la carne (El Agro, 2012).

Constituye una importante fuente de vitaminas: Ácido Ascórbico (Vitamina C), Riboflavina (Vitamina B2), Niacina (Vitamina B3) y minerales: calcio en un 0,48% y fósforo en un 0,43%. Además, presenta un elevado contenido de aceite de un 14-24%, prevaleciendo los ácidos grasos Oleico (48%), Linoleico (27%) y Linolénico (2.56%) (Sánchez, R.; Madrid, J., 2004).

En el Cuadro 1 y 2 se puede observar el análisis bromatológico del chocho y su perfil de ácidos grasos respectivamente.

**Cuadro 1.** Análisis bromatológico del chocho amargo y desamargado

	<b>COMPONENTE</b>	<b>CHOCHO AMARGO</b>	<b>CHOCHO DESAMARGADO</b>
<b>%</b>	<b>Proteína</b>	47.80	54.05
	<b>Grasa</b>	18.90	21.22
	<b>Fibra</b>	11.07	10.37
	<b>Cenizas</b>	4.52	2.54
	<b>Humedad</b>	10.13	77.05
	<b>ELN</b>	17.62	11.82
	<b>Alcaloides</b>	3.26	0.03
	<b>Azúcares totales</b>	1.95	0.73
	<b>Azúcares reductores</b>	0.42	0.61
	<b>Almidón total</b>	4.34	2.88
	<b>K</b>	1.22	0.02
	<b>Mg</b>	0.24	0.07
	<b>Ca</b>	0.12	0.48
	<b>P</b>	0.60	0.43
<b>ppm</b>	<b>Fe</b>	78.45	74.25
	<b>Zn</b>	42.84	63.21
	<b>Mn</b>	36.72	18.47
	<b>Cu</b>	12.65	7.99

FUENTE: Allauca y colaboradores, 2005

#### 1.4.4. Ácidos Grasos

**Cuadro 2:** Perfil de ácidos grasos del Aceite de Oliva y del Aceite de Chocho

ÁCIDOS GRASOS	OLIVA	CHOCHO CRUDO DESAMARGADO	CHOCHO REFINADO DESAMARGADO	CHOCHO REFINADO AMARGO
	%	%	%	%
<b>Mirístico</b>	-	-	0.20	0.30
<b>Palmitico</b>	8.77	11.88	11.72	15. 10
<b>Esteárico</b>	4.07	6.57	6.46	6.31
<b>Oleico</b>	30.02	48.09	48.68	48.16
<b>CIS isómeros C18:1</b>	1.51	0.68	-	-
<b>TRANS isómerosC18:2</b>	1.01	-	-	-
<b>Linoléico</b>	52.12	28.40	28.17	25.97
<b>Linolénico</b>	0.48	2.56	2.54	2.39
<b>Laurico</b>	-	-	0.28	0.22

FUENTE: Allauca y colaboradores, 2005



#### **1.4.5. Propiedades medicinales**

- Usado para eliminar parásitos de los animales.
- Empleado para caída de cabello y caspa.
- Ayuda a diferentes enfermedades: diabetes, males renales, males hepáticos y reumáticos. Además es usado como sedante, tónico cardíaco, antiespasmódico (Cayturo, 2012) y antiinflamatorio (Millán, 2014).
- Y es un excelente antiséptico, antimicrobiano (De la Vega, 1999) y cicatrizante (Domínguez, 2003).

#### **1.4.6. Papel en los vegetales**

- Productos secundarios del metabolismo de los vegetales
- Reguladores del crecimiento
- Sustancias de reserva nitrogenada para la síntesis proteica
- Productos finales de reacciones de decodificación en vegetales
- Función protectora frente a ataques de insectos, parásitos, animales herbívoros, distintos predadores (parásitos o insectos) (De la Cuba, 1994).

#### **1.4.7. Principales Metabolitos Secundarios**

El Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) está compuesto principalmente proteína, flavonoides, tocoferoles y alcaloides quinolizidínicos: en mayor porcentaje lupanina y esparteína (la esparteína es usada como tónico cardíaco, antiespasmódico y sedante) (El Agro, 2012). Sin embargo, también contiene taninos aunque en menor porcentaje por taninos. (Biolley, 2007).

#### **1.4.8. Flavonoides**

Los flavonoides son compuestos poli fenólicos que actúan en defensa del ataque de microorganismos, insectos, rayos UV, etc. (Marcano & Hasegawa, 2002). Y como acción farmacológica actúan como: antioxidantes, analgésicos, cardiotónicos, antimicrobianos, antitrombóticos y cicatrizantes (Cañigüeral, 2003). El chocho contiene Isoflavonas entre ellas: Genisteína (INIAP, 2006), 2.44 mg de Genisteína en 100 mg de grano de chocho (Galvez., et al., 2008).

#### **1.4.9. Fitoesteroles**

Los fitoesteroles son esteroides de origen vegetal que se encuentran en los frutos, semillas, hojas y tallos. Su estructura química es muy similar a la del colesterol. Sin embargo, la diferencia estructural radica en la cadena hidrocarbonada lateral, que suele presentar sustituyentes de tipo metilo o etilo. Su acción farmacológica es el efecto bactericida, así como también, se les atribuye propiedades antiinflamatorias, fungicidas y hipocolesterolémicas (López, 2005). Incluso según Guadagnucci, et al., 2012 , otorga un efecto protector en el desarrollo de esteatosis hepática.

El chocho 450 Andino tiene 15 mg /100g de colestano, 22.72 mg/ /100g de campesterol, 23.33 de estigmasterol y 24.62 de  $\beta$ - Sitosterol. En cambio el chocho Criollo tiene 15.01mg /100g de colestano, 22.67 mg/ /100g de campesterol, 23.48 de estigmasterol y 24.33 de  $\beta$ - Sitosterol (Pástor, y otros, 2013).

#### **1.4.10. Tocoferoles**

Es el nombre de varios compuestos orgánicos conformados por varios fenoles metilados. Su acción farmacológica es actuar como antioxidantes. (Tsaliki, E., 1999). Su uso en las diferentes formulaciones cosméticas es proteger la oxidación de la fase lipídica (Challem & Block, 2008). Según estudios realizados, el chocho 450 Andino tiene 427 ppm de  $\gamma$ - tocoferol mientras que el chocho Criollo presenta 746.95 ppm de  $\gamma$ - tocoferol (Pástor, y otros, 2013).

#### **1.4.11. Taninos**

Compuestos fenólicos capaces de precipitar proteínas a partir de disoluciones acuosas. Sobre la piel y las mucosas forman una capa seca y resistente a la putrefacción, interviniendo en procesos inflamatorios y favoreciendo a la cicatrización de heridas (Bruneton, Jean, 2001). En el género *Lupinus* hay aproximadamente 0.31% de Taninos. (Galvez., et al., 2008)

### **1.5. ALCALOIDES**

Los alcaloides etimológicamente proviene del árabe *al kaly*, la sosa y del griego *eidos*, de aspecto. Y se definen como sustancias orgánicas nitrogenadas generalmente con característica básicas y mayoritariamente de origen vegetal, tienen estructuras complejas lo que hace que ejerzan diferentes acciones fisiológicas (Brossi, 1987).

Su acción farmacológica está dirigida a actuar a nivel del sistema nervioso e intervenir en estados depresivos, convulsivos y trastornos neurológicos (De la Cuba, 1994).

#### **1.5.1. Características de los Alcaloides**

- Compuestos orgánicos
- Origen vegetal
- Se encuentran como sales
- Se forman a partir de aminoácidos
- Formados por Nitrógeno y también por Oxígeno por lo general. El nitrógeno proporciona las características de álcalis
- Existen alcaloides volátiles y no volátiles, los primeros son líquidos y no contienen Oxígeno en su mayoría y los segundos son sólidos.
- Actividad fisiológica incluso a dosis muy bajas

- Son insolubles o poco solubles en agua
- Son solubles en alcohol, éter, cloroformo, éter de petróleo, benceno
- La mayoría presentan coloración blanca
- Precipitan con ciertos reactivos
- Se combinan con ácidos para dar sales, comportándose entonces como bases.
- Para liberar los alcaloides de sus sales, se debe agregar álcalis.
- Las sales son bastante solubles en agua e insolubles en solventes orgánicos (SOTO, 2007).

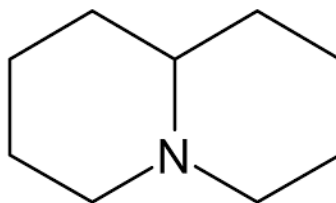
## **1.6. ALCALOIDES QUINOLIZIDÍNICOS**

En el chocho, los alcaloides son de tipo quinolizidínicos. Estos alcaloides poseen un heterociclo nitrogenado bicíclico (Quinolizidina) y son de carácter básico. Generalmente se extraen con soluciones de ácidos en agua, con lo cual se separan los alcaloides y sus sales.

Estos compuestos están presentes en todas las especies del género *Lupinus*, se sintetizan en los cloroplastos de las hojas y se distribuyen a ramas, tallos y semillas (Arias, 2000).

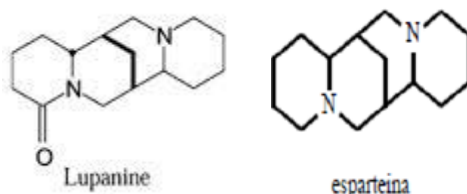
La Lupanina, es el alcaloide quinolizidínico que se encuentra en mayor porcentaje en todos los géneros de *Lupinus* (Ganzera, M.; Kruger, A., 2010)

**GRÁFICO 4.** Estructura química de la Quinolizidina



FUENTE: Soto M, 2007

**GRÁFICO 5.** Estructura química de la Lupanina y Esparteína



FUENTE: Soto M, 2007

### 1.6.1. *Alcaloides del chocho*

El chocho presenta los siguientes alcaloides: 46% de lupanina (ocupa el 2.5% en el grano crudo y el 11.5% en el extracto), 14% de esparteína (ocupa el 0.32% en el grano crudo y el 2.5% en el extracto), 10% de 4-hidroxilupanina, 3% de n-metilangustifolina, 3% de isolupanina y 1% de 13-hidroxilupanina (INIAP-ESPOCH-SENACYT, 2008).

#### 1.6.1.1. *Acción farmacológica: Lupanina y Esparteína*

La lupanina y esparteína son alcaloides quinolizidínicos que poseen numerosas potencialidades farmacológicas entre ellas son útiles como efectos inhibidores de enzimas, como antimicrobianos, y antiinflamatorios (Duplex., et al., 2013). Además, entre otras actividades se destacan efectos hipoglucemiantes por parte de la Lupinina (Bobkiewicz., et al., 2007), mientras que la esparteína tiene efectos cardiovasculares y antiarrítmicos (Hayes., et al., 1995).

### **1.6.2.    *Propiedades físico-químicas de los alcaloides del chocho***

Los alcaloides antes mencionados tienen propiedades alcalinas, por la presencia del nitrógeno básico constituyendo núcleos heterocíclicos. Estos son insolubles en agua en forma libre, poco solubles en alcohol y solubles en cloroformo y éter.

Además la mayoría poseen oxígeno en su estructura y son sólidos no volátiles, a excepción de la esparteína es líquida a temperatura ambiente y no hay oxígeno en su estructura (INIAP- ESPOCH-SENACYT, 2008).

### **1.6.3.    *Toxicidad de los alcaloides del chocho***

Los alcaloides son tóxicos a dosis muy altas tanto en personas como en animales. Los síntomas de toxicidad en las personas son: cianosis, parálisis respiratoria, midriasis, calambres, dolor estomacal intenso, vómito, pérdida del conocimiento e incluso coma.

Según datos registrados las semillas de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet), producen graves intoxicaciones a dosis de 11 a 25mg/Kg de peso corporal en niños y dosis de 25 a 46 mg/Kg de peso corporal en adultos. (Campana, 1988).

### **1.6.4.    *Identificación de los alcaloides***

Como los alcaloides precipitan con ciertos reactivos, se pueden identificar con la coloración que presentan estos precipitados. Así tenemos:

- La reacción con el Reactivo de Mayer (tetraiodo mercuriato de potasio) da lugar a la formación de un precipitado amarillento amorfo o cristalino.
- El Reactivo de Dragendorff (yodo bismutato de potasio) forma precipitados de colores rojo anaranjado y en general amorfos.

El procedimiento para estos reactivos generales comienza con la evaporación de 2 a 3 gotas del extracto etanólico en vidrio de reloj. Se agregan luego 2 a 3 gotas de ácido clorhídrico 5% hasta solubilizar los residuos. A esta solución se agrega una gota del reactivo correspondiente (Duhart, Bustos, Hernández, & Becerra).

### **1.7. GELES**

Formas farmacéuticas semisólidas formadas por líquidos gelificados con la ayuda de un agente gelificante. Están destinados para aplicarse sobre la piel y mucosas, no tienen poder de penetración; por esta razón se utilizan para ejercer acción tópica de superficie. Entre sus ventajas se encuentra: sensación de frescor, fácil aplicación, fácil de lavar y tolerables por la piel. (García, 2002)

### **1.8. DOSIS LETAL 50 (DL50)**

La DL50 se desarrolló en 1927 para medir la toxicidad aguda de ciertos compuestos en animales vivos. Consiste en la administración forzada mediante ingesta, inhalación o vías parenterales, de distintas cantidades de una sustancia, lo que conlleva dolorosas y agonizantes consecuencias para los animales (ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA, 1995).

El test se detiene cuando muere el 50% de la población de los animales (lo que suele suceder al cabo de unos días), y el 50% que sobrevive es sacrificado para determinar diferentes parámetros de órganos y tejidos (Hernández, 2011).

En teoría, el test DL50 proporciona información sobre la cantidad de sustancia necesaria para tener efectos no deseados en los humanos. Cabe destacar que el DL50 mide la dosis mortal, pero no otros efectos secundarios graves pero no letales. (Hernández, 2011).

Los resultados obtenidos de este test varían significativamente debido a diferentes variables, tales como la especie animal, la cepa, la edad, el peso, el sexo, el estado de salud, la dieta, si el animal ha pasado una fase de ayuno antes del test, el método de administración, la temperatura del estabulario (lugar donde están alojados los animales de laboratorio), el tipo de jaula, etc (ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA, 1995).



## CAPITULO II

### 2. PARTE EXPERIMENTAL

#### 2.1. LUGAR DE INVESTIGACIÓN

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales – Fitoquímica de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, en el Departamento de Nutrición y Calidad del INIAP, en los laboratorios de la Facultad de Ciencias de la Salud y en el Bioterio de la Universidad Nacional de Chimborazo.

#### 2.2. MATERIALES Y REACTIVOS

##### 2.2.1. *Material Vegetal*

Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet)

- Cantón: Mejía
- Provincia: Pichincha
- Altitud: 2800 y 3500 m.s.n.m.
- Temperatura : 7° a 14° C
- Partes a utilizar: Semillas
- pH del suelo: arenoso 5.5 a 7.0 (Delgado, 2010).

Las variedades de chocho: 450 Andino y Criollo fueron proporcionadas por el Instituto Nacional Autónomo de Investigación Agropecuaria (INIAP) y serán recolectadas en la estación experimental “Santa Catalina” (INIAP, 2011).

##### 2.2.2. *Material de Laboratorio*

- Algodón
- Bajalenguas
- Balones esmerilados
- Equipo de disección
- Embudo simple
- Embudos de separación

- Erlenmeyer
- Espátula
- Gradillas
- Guantes
- Mascarilla
- Papel aluminio
- Papel filtro
- Parafilm
- Pera de succión
- Pinzas para tubos
- Pipetas
- Pizeta
- Placas Petrifilm
- Probeta
- Puntas para pipetas
- Recipientes ámbar
- Reverbero
- Sacabocados
- Tiras medidoras de pH
- Tubos de ensayo
- Varilla de agitación
- Vasos de precipitación
- Vidrio reloj

### **2.2.3. Reactivos**

- Ácido clorhídrico al 1 % en agua
- Ácido sulfúrico
- Agua destilada
- Alcohol amílico
- Anhídrido acético
- Carbopol
- Cinta de magnesio metálico
- Cloroformo

- Crema depilatoria Veet
- Croduret
- Dimeticona
- Etanol (al 90%)
- Éter de petróleo
- Glicerina
- Goma Xanthan
- Hematoxilina -eosína
- Hexano
- Hidróxido de Sodio al 5%
- Metil parabeno
- Propil parabeno
- Reactivo de Baljet
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Fehling
- Solución al 2 % de ninhidrina en agua
- Tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica
- Trietanolamina
- Trolamina
- Tween 80

### **2.3. EQUIPOS**

- Autoclave (TUTTNAUER Modelo 2540)
- Balanza analítica (Mettler Toledo Ab-S/Fact)
- Baño de flotación (Thermo Scientific™)
- Cámara de Flujo Laminar (Biobase BBS-H1300)
- Contador de colonias (Qumis - Q295B)
- Estufa (MEMMERT UN450)
- Medidor de extensibilidad (ThermoHaake)
- Microscopio óptico (Motic® - BA 310)
- Micrótopo (Thermo Scientific™ Finesse 325)
- Peachímetro (Mettler Toledo - S20K)

- Pie de rey (Insize 1223)
- Procesador de muestras (Thermo Scientific™ HistoStar™)
- Procesador de parafina (Thermo Scientific™ HistoStar™)
- Reverbero (Thermo Scientific™)
- Rotavapor (Yamato Scientific RE301/601/801)

## **2.4. TÉCNICAS Y MÉTODOS**

A continuación, se muestran los métodos y técnicas que se emplearon para la obtención de cada uno de los objetivos planteados en la investigación.

### **2.4.1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS, ALCALOIDALES Y LIPÍDICOS DE DOS VARIEDADES DE CHOCHO (*Lupinus mutabilis Sweet*): 450 ANDINO Y CRIOLLO.**

En el proceso de obtención de los diferentes extractos: etanólicos, alcaloidales y lipídicos se realizaron varios procedimientos, los cuales se describen a continuación.

#### **2.4.1.1. Obtención de los extractos etanólicos**

Se pesó 200 g de harina proveniente de granos molidos de cada variedad de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*). Luego se añadió 500 mL de EtOH 90% y colocado en un frasco ámbar; se maceró por 4 días, en un lugar protegido de la luz y se agitó esporádicamente.

Pasado el tiempo se filtró y se procedió a concentrar, con la ayuda del Rotavapor a 70°C a 150 rpm, durante 20 min.

#### 2.4.1.2. Obtención de extractos alcaloidales

Se pesó 200g de granos de cada variedad de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) en un vaso de precipitación, se añadió 800mL de agua destilada. Se procedió con la decocción durante 30 minutos, se enfrió y se filtró.

Al filtrado (extracto acuoso) se adicionó 5mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y  $\text{NH}_4\text{OH}$  con el fin de obtener un pH igual a 11 y facilitar la extracción de los alcaloides (INIAP, 2006).

Luego se trasvasa este extracto acuoso a un embudo de separación, añadiendo éter de petróleo y agitando constantemente hasta que los alcaloides de la fase acuosa pasen a la fase etérea.

Se dejó en reposo hasta que se separen las fases y se recoge la fase superior (fase etérea) obteniendo de esta manera el extracto etéreo. Para posteriormente, concentrar, con la ayuda del Rotavapor a 45°C, a 150 rpm durante 20 min.

#### 2.4.1.3. Obtención de los extractos lipídicos

Se realizó 6 dedales con papel filtro, para cada variedad de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet), se pesó 200g de granos molidos. Se distribuyó en los 6 dedales, sellados con algodón impidiendo que se riegue la muestra.

Se procedió a macerar los dedales durante 6 días, adicionando 250mL de hexano en un recipiente cerrado con papel aluminio.

Para la extracción de los aceites se utilizó el Equipo de Soxhlet, se filtró y después se concentró y recuperó el hexano utilizando el Rotavapor a 45°C, a 150 rpm durante 20 min.

#### **2.4.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS GRUPOS QUÍMICOS PRESENTES EN CADA EXTRACTO, MEDIANTE EL TAMIZAJE FITOQUÍMICO**

La identificación de los diferentes grupos químicos se realizó mediante la determinación cualitativa de los ensayos del Tamizaje Fitoquímico. Para esto se empleó el método de Miranda (Manual de prácticas de laboratorio de Farmacognosia y Productos naturales. 2000).

#### **2.4.3. DETERMINACION DE TOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS, ALCALOIDALES Y LIPÍDICOS DE DOS VARIEDADES DE CHOCHO (*Lupinus mutabilis* Sweet): 450 ANDINO Y CRIOLLO.**

##### **2.4.3.1. BIOENSAYO DE TOXICIDAD DEL CHOCHO 450 Y CHOCHO CRIOLLO EN *Artemia salina***

###### **Día 1**

- Se prepara agua de mar (3.8g de sal en grano en 100mL de agua destilada) y se filtra.
- En seguida, se prepara como alimento levadura (0.6g de levadura en 100mL de agua destilada).
- Se colocó 50mg de huevos de *Artemia salina* en un Erlenmeyer con 350mL de agua de mar y después se ubicó una bomba de oxígeno a burbujeo lento con fuente de luz

###### **Día 2**

- Se transfiere la mayor cantidad de nauplios vivos a un Erlenmeyer con agua de mar fresca y se pesa 20mg de extracto etanólico, alcaloidal y lipídico de las dos variedades de chocho 450 y Criollo

### **Día 3**

- Se disuelve los 20mg de extracto etanólico y alcaloidal en 2mL de agua destilada
- Mientras, que el extracto lipídico en 0.5mL de DMSO y 1.5mL de agua destilada.
- A partir de esta solución se prepara diluciones de 1000, 100 y 10 ppm, transfiriendo a cada vial 500, 50 y 5  $\mu$ L(son 3 viales por cada concentración).
- A cada vial se agregan 10 nauplios más agua de mar hasta completar 5mL por vial y 1 gota de levadura.

### **Día 4**

- Después de 24h, se cuenta y anota el número de sobrevivientes en cada dilución (Ver Anexo 1)

#### **2.4.3.2. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL $50_{(DL50)}$ DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS, ALCALOIDALES Y LIPÍDICOS DEL CHOCHO 450 Y CHOCHO CRIOLLO EN RATONES (*Mus musculus*)**

Para la determinación de la Dosis Letal DL50, se realiza la Evaluación de la Toxicidad Aguda con cada extracto de las dos variedades de chocho (Ver Anexo 2).

#### 2.4.3.2.1. Determinación de la DL50 de los extractos etanólicos del chocho 450 y chocho criollo

##### Preparación del material biológico

Para cada ensayo con chocho 450 y chocho criollo, se utilizan 13 ratones machos albinos *Mus musculus* de 2 a 3 meses de edad, con peso entre 30 a 40g separados e identificados en 4 grupos de 3 ratones cada uno. Y el ratón restante corresponde al BLANCO.

Los ratones previo el ensayo deben estar en ayunas de 12 h solo con agua.

##### Preparación de las dosis

Calcular los mL a administrar de acuerdo a las dosis prueba (5000, 2500, 1250 y 625 mg/kg) y peso de ratón

**Cuadro 3:** Mililitros administrados en la DL50 del extracto etanólico del chocho 450

Código de los animales	Peso (g)	Conc. Soln 1 (g/mL)	Dosis prueba (mg/kg)	mg	Gramos (g)	mL teóricos	mL administrados
1	43,5	0,15	5000	217,5	0,218	1,45	1,5
2	42,9	0,15	5000	214,5	0,215	1,43	1,4
3	41,9	0,15	5000	209,5	0,210	1,396666667	1,4
4	41	0,15	2500	102,5	0,103	0,683333333	0,7
5	40,8	0,15	2500	102	0,102	0,68	0,7
6	40,7	0,15	2500	101,75	0,102	0,678333333	0,7
7	40,6	0,15	1250	50,75	0,051	0,338333333	0,3
8	40,3	0,15	1250	50,375	0,050	0,335833333	0,3
9	40,3	0,15	1250	50,375	0,050	0,335833333	0,3
10	38,3	0,15	625	23,9375	0,024	0,159583333	0,2
11	36,2	0,15	625	22,625	0,023	0,150833333	0,2
12	36,1	0,15	625	22,5625	0,023	0,150416667	0,2
13	35,3	BLANCO	CON	SUERO	FISIOLÓGICO		0,4

AUTOR: CASTILLO S, 2014



**Cuadro 4:** Mililitros administrados en la DL50 del extracto etanólico del chocho Criollo

Código de los animales	Peso (g)	Conc. Sln 1 (g/mL)	Dosis prueba (mg/kg)	mg	Gramos (g)	mL teóricos	mL administrados
1	43,5	0,15	5000	217,5	0,218	1,45	1,5
2	42,9	0,15	5000	214,5	0,215	1,43	1,4
3	41,9	0,15	5000	209,5	0,210	1,39666667	1,4
4	41	0,15	2500	102,5	0,103	0,68333333	0,7
5	40,8	0,15	2500	102	0,102	0,68	0,7
6	40,7	0,15	2500	101,75	0,102	0,67833333	0,7
7	42,5	0,15	1250	53,125	0,053	0,35416667	0,4
8	39,3	0,15	1250	49,125	0,049	0,3275	0,3
9	37,1	0,15	1250	46,375	0,046	0,30916667	0,3
10	36,7	0,15	625	22,9375	0,023	0,15291667	0,2
11	36,3	0,15	625	22,6875	0,023	0,15125	0,2
12	35,7	0,15	625	22,3125	0,022	0,14875	0,1
13	34,5	BLANCO	CON	SUERO	FISIOLÓGICO		0,4

AUTOR: CASTILLO S, 2014

### Administración de las dosis

El extracto etanólico previamente reconstituido y diluido en suero fisiológico, fue administrado por vía oral, mediante cánula orogástrica. Se ensayaron cuatro niveles de dosis, desde una máxima hasta una mínima.

### Evaluación de la Toxicidad Aguda

Los animales fueron observados durante las primeras 24 horas y diariamente durante 7 días, registrando cualquier cambio de comportamiento observable en la ficha de PAUTAS DE OBSERVACIÓN.

**Cuadro 5: Pautas de Observación**

TIPO DE ANÁLISIS:										CONCENTRACIÓN:				
ANIMAL N°:										DOSIS:				
SEXO DEL ANIMAL:										mL TEÓRICOS:				
PESO DEL ANIMAL:										mL ADMINISTRADOS:				
EXTRACTO ANALIZADO:										HORA DE ADMINISTRACIÓN:				
FECHA DE ANÁLISIS:										ANALISTA:				
TIPO DE POST ADMINISTRACION	10min	30min	1h	3h	6h	10h	24h	2d	3d	4d	5d	6d	7d	
Disminución de actividad motora														
Aumento de la actividad motora														
Ataxia														
Pérdida de reflejo de enderezamiento														
Mucosas pálidas														
Mucosas cianóticas														
Erección de la cola														
Pilo erección														
Diarrea														
Pasivo														
Agresivo														
Actividad prensil														
Reflejo corneal														
Equilibrio														
Test de Chimenea(neuromuscular)														
Micción														
Mortalidad														

AUTOR: CASTILLO S, 2014

El peso, también fue controlado y registrado al primer, tercer, quinto y séptimo día del experimento.

Al finalizar este periodo, se procedió al sacrificio de los animales para continuar con la disección y comparación de los órganos de los grupos con tratamiento y los órganos del blanco (Ver Anexo 3)

#### 2.4.3.2.2. *Determinación de la DL50 de los extractos alcaloidales del chocho 450 y chocho criollo*

#### **Preparación del material biológico**

Para cada ensayo con chocho 450 y chocho criollo, se utilizan 13 ratones machos albinos *Mus musculus* de 2 a 3 meses de edad, con peso entre 20 a 40g

separados e identificados en 4 grupos de 3 ratones cada uno. Y el ratón restante corresponde al BLANCO.

Los ratones previo el ensayo deben estar en ayunas de 12 h solo con agua.

### Preparación de las dosis

Calcular los mL a administrar de acuerdo a las dosis prueba (5000, 2500, 1250 y 625 mg/kg) y peso de ratón

**Cuadro 6:** Mililitros administrados en la DL50 del extracto alcaloidal del chocho  
450

Código	Peso (g)	Conc. Soln 1 (g/mL)	Dosis prueba (mg/kg)	mg	Gramos (g)	mL teóricos	mL administrados
1	38,7	0,15	5000	193,5	0,194	1,29	1,3
2	38,7	0,15	5000	193,5	0,194	1,29	1,3
3	38,3	0,15	5000	191,5	0,192	1,276666667	1,3
4	37,9	0,15	2500	94,75	0,095	0,631666667	0,6
5	37,9	0,15	2500	94,75	0,095	0,631666667	0,6
6	37,5	0,15	2500	93,75	0,094	0,625	0,6
7	37,2	0,15	1250	46,5	0,047	0,31	0,3
8	36,2	0,15	1250	45,25	0,045	0,301666667	0,3
9	35,8	0,15	1250	44,75	0,045	0,298333333	0,3
10	35,3	0,15	625	22,0625	0,022	0,147083333	0,1
11	31,9	0,15	625	19,9375	0,020	0,132916667	0,1
12	30,6	0,15	625	19,125	0,019	0,1275	0,1
13	32,1	BLANCO	CON	SUERO	FISIOLÓGICO		0,4

AUTOR: CASTILLO S, 2014

**Cuadro 7:** Mililitros administrados en la DL50 del extracto alcaloidal del chocho  
Criollo

Código	Peso (g)	Conc. Soln 1 (g/mL)	Dosis prueba (mg/kg)	mg	Gramos (g)	mL teórico	mL administrados
1	32,7	0,15	5000	163,5	0,164	1,09	1,1
2	32,7	0,15	5000	163,5	0,164	1,09	1,1
3	31,3	0,15	5000	156,5	0,157	1,043333	1
4	31,1	0,15	2500	77,75	0,078	0,518333	0,5
5	30,9	0,15	2500	77,25	0,077	0,515	0,5
6	29,4	0,15	2500	73,5	0,074	0,49	0,5
7	29	0,15	1250	36,25	0,036	0,241667	0,2
8	28,8	0,15	1250	36	0,036	0,24	0,2
9	28,5	0,15	1250	35,625	0,036	0,2375	0,2
10	28,5	0,15	625	17,8125	0,018	0,11875	0,1
11	28,4	0,15	625	17,75	0,018	0,118333	0,1
12	28	0,15	625	17,5	0,018	0,116667	0,1
13	35,5	BLANCO	CON	SUERO	FISIOLÓGICO		0,4

AUTOR: CASTILLO S, 2014

## **Administración de las dosis**

El extracto alcaloidal previamente reconstituido y diluido en suero fisiológico, fue administrado por vía oral, mediante cánula orogástrica.

Se ensayaron cuatro niveles de dosis, desde una máxima hasta una mínima.

## **Evaluación de la Toxicidad Aguda**

Los animales fueron observados durante las primeras 24 horas y diariamente durante 7 días, registrando cualquier cambio de comportamiento observable en la ficha de PAUTAS DE OBSERVACIÓN.

El peso, también fue controlado y registrado al primer, tercer, quinto y séptimo día del experimento.

Al finalizar este periodo, se procedió al sacrificio de los animales para continuar con la disección y comparación de los órganos de los grupos con tratamiento y los órganos del blanco.

### **2.4.3.2.3. *Determinación de la DL50 de los extractos lipídicos del chocho 450 y chocho criollo***

## **Preparación del material biológico**

Para cada ensayo con chocho 450 y chocho criollo, se utilizan 13 ratones machos albinos *Mus musculus* de 2 a 3 meses de edad, con peso entre 20 a 30g separados e identificados en 4 grupos de 3 ratones cada uno. Y el ratón restante corresponde al BLANCO.

Los ratones previo el ensayo deben estar en ayunas de 12 h solo con agua.

## Preparación de las dosis

Calcular los mL a administrar de acuerdo a las dosis prueba (64, 32, 16 y 8 mL/kg) y peso de ratón.

**Cuadro 8:** Mililitros administrados en la DL50 del extracto lipídico del chocho 450

Código	Peso (g)	Dosis prueba (mL/kg)	mL teóricos	mL administrados
1	34,7	64	2,2208	2,2
2	34,2	64	2,1888	2,2
3	33,7	64	2,1568	2,2
4	33,4	32	1,0688	1,1
5	32,4	32	1,0368	1,0
6	31,3	32	1,0016	1,0
7	30,9	16	0,4944	0,5
8	30,3	16	0,4848	0,5
9	29	16	0,464	0,5
10	26,5	8	0,212	0,2
11	26,3	8	0,2104	0,2
12	24,9	8	0,1992	0,2
13	36,4	10	0,364	0,4

AUTOR: CASTILLO S, 2014

**Cuadro 9:** Mililitros administrados en la DL50 del extracto lipídico del chocho Criollo

Código	Peso (g)	Dosis prueba (mL/kg)	mL teóricos	mL administrados
1	26,7	64	1,7088	1,7
2	26,4	64	1,6896	1,7
3	25,1	64	1,6064	1,6
4	24,6	32	0,7872	0,8
5	24,3	32	0,7776	0,8
6	24,1	32	0,7712	0,8
7	24	16	0,384	0,4
8	23,4	16	0,3744	0,4
9	23,3	16	0,3728	0,4
10	22,7	8	0,1816	0,2
11	22,6	8	0,1808	0,2
12	21	8	0,168	0,2
13	23,3	10	0,233	0,2

AUTOR: CASTILLO S, 2014

## **Administración de las dosis**

El extracto lipídico, fue administrado por vía oral, mediante cánula orogástrica directamente del frasco.

Se ensayaron cuatro niveles de dosis, desde una máxima hasta una mínima.

## **Evaluación de la Toxicidad Aguda**

Los animales fueron observados durante las primeras 24 horas y diariamente durante 7 días, registrando cualquier cambio de comportamiento observable en la ficha de PAUTAS DE OBSERVACIÓN.

El peso, también fue controlado y registrado al primer, tercer, quinto y séptimo día del experimento.

Al finalizar este periodo, se procedió al sacrificio de los animales para continuar con la disección y comparación de los órganos de los grupos con tratamiento y los órganos del blanco.

### **2.4.3.3.      *ENSAYO DE IRRITABILIDAD DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS, ALCALOIDALES Y LIPÍDICOS DEL CHOCHO 450 Y CHOCHO CRIOLLO***

Para cada ensayo de irritabilidad de los extractos etanólicos, alcaloidales y lipídicos de las dos variedades de chocho, se selecciona al azar 2 ratones.

Depilado el dorso de los ratones con crema depilatoria Veet y pasadas las 48 horas, se debe aplicar 1mL de cada extracto.

La zona de aplicación debe ser cubierta con gasa y fijada con cinta hipoalérgica. Los sitios de aplicación, deben examinarse a los 30 minutos, 6 y 24 horas.

Después de la remoción de la gasa se debe detectar presencia de edema o eritema (Ver Anexo 4).

#### **2.4.4. ELABORACIÓN DE GELES DE LAS DOS VARIEDADES DE *Lupinus mutabilis* Sweet Y CONTROL DE CALIDAD DE LOS MISMOS**

##### **2.4.4.1. FORMULACIÓN DE LOS GELES**

Para la elaboración de los geles se realizó distintas formulaciones para los tres tipos de extractos etanólicos, alcaloidales y lipídicos.

##### **2.4.4.1.1. Formulación del Gel con Extracto Etanólico**

Para 100g de gel:

- a)** En 90mL de agua, se añadió 0.2g de Goma xanthan y se agitó hasta que desaparezca los grumos. Luego se incorporó 0.8 g de Carbopol, se mezcló bien y se dejó en reposo durante 24 h.  
Se añade 2.4 g de Dimeticona agitando hasta que se afloje el gel; se adiciona 0.4 g de TEA y se agita hasta que se visualice uniforme.
- b)** Luego en 3 mL de agua caliente disolver 0.090g de Metil parabeno sódico y 0.010g de Propil parabeno sódico.
- c)** Inmediatamente, en 2g de extracto Etanólico de chocho 450 y Criollo se agregó 1g de glicerina.
- d)** Se une y mezcla bien lo indicado en el paso b y c.
- e)** Finalmente, se incorpora el paso d al a.

#### 2.4.4.1.2. *Formulación del Gel con Extracto Alcaloidal*

Para 100g de gel:

- a) En 90mL de agua, se añadió 0.2g de Goma xanthan y se agitó hasta que desaparezca los grumos. Luego se incorporó 0.8 g de Carbopol, se mezcló bien y se dejó en reposo durante 24 h.  
Se añade 2.4 g de Dimeticona agitando hasta que se afloje el gel; se adiciona 0.4 g de TEA y se agita hasta que se visualice uniforme.
- b) Luego en 3 mL de agua caliente disolver 0.090g de Metil parabeno sódico y 0.010g de Propil parabeno sódico.
- c) Inmediatamente, en 2g de extracto Alcaloidal de chocho 450 y Criollo se agregó 1g de glicerina.
- d) Se une y mezcla bien lo indicado en el paso b y c.
- e) Finalmente, se incorpora el paso d al a.

#### 2.4.4.1.3. *Formulación del Gel con Extracto Lipídico*

Para 100g de gel:

##### **Fase Acuosa**

- En 90mL de agua, se añadió 0.2g de Goma xanthan y se agitó hasta que desaparezca los grumos. Luego se incorporó 0.8 g de Carbopol, se mezcló bien y se dejó en reposo durante 24h.

Se añade 2.4 g de Dimeticona agitando hasta que se afloje el gel; se adiciona 0.4 g de TEA y se agita hasta que se visualice uniforme.



## **Fase Oleosa**

- Se mezcla 2g de extracto Lipídico de chocho 450 y Criollo más 0.25g de Croduret y 0.4g de Tween 80.
- Se agrega 1g de glicerina y se bate bien hasta que desaparezca el aspecto aceitoso.
- Para finalizar, se incorpora poco a poco esta Fase Oleosa a la Fase Acuosa.

### **2.4.4.2. CONTROL DE CALIDAD DE LOS GELES**

Antes de la elaboración de los geles, se procedió a realizar el control de calidad de cada uno de los excipientes utilizados en los mismos.

Análisis conformes a: USP 35 Farmacopea de los Estados Unidos Americanos  
5ta Edición del año 2012

#### **2.4.4.2.1. Agua purificada**

Descripción: Líquido transparente, incoloro e inodoro.

pH: 5.0 - 7.5

Cloruros: A 100 mL de la muestra, añadir 5 gotas de ácido nítrico y 1 mL de nitrato de plata.

No debe aparecer opalescencia en la solución luego de transcurrir 15 minutos.

Sulfatos: A 100 mL de muestra añadir 1 mL de Cloruro de bario. No debe presentar turbidez.

Calcio: A 100 mL de muestra añadir 2 mL de oxalato de amonio. No debe presentar turbidez.

Sólidos Totales: Evaporar a sequedad 100 mL de muestra en baño maría y secar a 105°C durante 1 hora. El total de residuo no deberá ser mayor a 1 mg

Microbiología:	Aerobios totales	<10 ufc/g
	Mohos y levaduras	Ausencia
	Patógenos	Ausencia

#### 2.4.4.2.2. *Carbopol*

Descripción: Polvo blanco, ligero, de olor tenue y característico. Higroscópico.

Solubilidad: Después de neutralizar con hidróxidos alcalinos, es soluble en agua, en alcohol.

Identificación: Ajustando a un pH de 7.5 con solución 1N de hidróxido de sodio, forma un gel sumamente viscoso.

Pérdida por secado: 1 gramo de muestra a 80°C. No pierde más del 2.0% de su peso

Microbiología:	Aerobios totales	<100 ufc/g
	Mohos y levaduras	<10 ufc/g
	Patógenos	Ausencia

#### 2.4.4.2.3. *Croduret*

Descripción: Mezcla semisólida amarillenta, derivado del aceite de castor, emulsificante y lubricante.

Solubilidad: Soluble en agua, etanol y acetona. Insoluble en glicerina, y aceites minerales.

Índice de saponificación: Entre 50.0 a 60.0 mgKOH/g

Pesar alrededor de 2,5 mL de muestra (filtrada si no es transparente) en un erlenmeyer, adicionar 25 mL de KOH, conectar el condensador y hervir hasta que la grasa este completamente saponificada (aproximadamente 30 min).

Enfriar y titular con HCl 0.5 N usando fenolftaleína como indicador.

Correr un blanco junto con las muestras. Reportar el índice de saponificación como los mg de KOH requeridos para saponificar un g de grasa.

#### 2.4.4.2.4. *Dimeticona*

Descripción: Líquido claro nuboso con un color ligeramente ámbar de olor característico

Densidad: 0.964 - 0.972 g/mL

Pérdida por secado: 1 g de muestra a 105°C. Máximo 0.3%.

#### 2.4.4.2.5. *Glicerina*

Análisis conformes a: USP 35 Farmacopea de los Estados Unidos Americanos 5ta Edición del año 2012

Descripción: Líquido siruposo claro e incoloro, de sabor dulce y no más de un ligero olor característico.

Color: Visto contra una superficie blanca, no es más oscura en comparación a un estándar (0,4 mL de cloruro férrico en 50 mL de agua).

Identificación: Mezclar 1 mL de la muestra, agregar cuidadosamente 0,5 mL de ácido nítrico, de no mezclar adicionar 0.5 mL de solución de dicromato de potasio

(10.6:10 m/v) se forma un anillo azul en la interface de los líquidos. Dejar reposar 10 minutos. El color no se difunde a la capa inferior.

Solubilidad: Miscible con agua, alcohol y metanol. Insoluble en cloroformo y éter.

Densidad: No menor de 1.249 g/mL

Cloruros: 1g de muestra en 10 mL de agua, adicionar 5 gotas de HNO<sub>3</sub> concentrado y 0,5 mL AgNO<sub>3</sub>. No debe haber presencia de precipitado blanco.

Sulfatos: 1g de muestra en 3 gotas HCl concentrado, adicionar 5 gotas de Cl<sub>2</sub>Ba. No debe haber presencia de precipitado blanco.

Microbiología:	Aerobios totales	<100 ufc/g
	Mohos y levaduras	<10 ufc/g
	Patógenos	Ausencia

#### 2.4.4.2.6. *Goma Xanthan*

Descripción: Polvo fino de color blanco a cremoso; el polvo es inodoro e insípido

Solubilidad: Soluble en agua fría o caliente dando soluciones altamente viscosas

pH: La solución acuosa es neutra al tornasol.

Pérdida de peso al secar: 2 g. de muestra a 105 ° C, la pérdida no debe ser más del 15% de su peso.

Microbiología:	Aerobios totales	<100 ufc/g
	Mohos y levaduras	<10 ufc/g
	Patógenos	Ausencia

#### 2.4.4.2.7. *Metil parabeno sódico*

Descripción: Polvo cristalino blanco de tenue olor característico y sabor quemante leve

Solubilidad: Fácilmente soluble en alcohol y éter. Ligeramente soluble en agua y benceno.

Punto de Fusión: 125 - 128°C

pH: Entre 9.5 y 10.5

Microbiología:	Aerobios totales	<100 ufc/g
	Mohos y levaduras	<10 ufc/g
	Patógenos	Ausencia

#### 2.4.4.2.8. *Propil parabeno sódico*

Descripción: Polvo cristalino blanco, inodoro o con algún olor característico. Hidroscópico.

Solubilidad: Soluble en agua y alcohol. Insoluble en aceites

pH: Entre 9.5 y 10.5 en una solución 1:100

Microbiología:

Aerobios totales	<100 ufc/g
Mohos y levaduras	<10 ufc/g
Patógenos	Ausencia

#### 2.4.4.2.9. *Trietanolamina (TEA)*

Análisis conforme a: USP 35 Farmacopea de los Estados Unidos Americanos 5ta Ed.

#### 2.4.4.2.10. *Tween 80*

Análisis conforme a: USP 25 Farmacopea de los Estados Unidos Americanos 17va Edición del año 2007

Descripción: Líquido oleoso de color amarillo a ámbar, tiene un tenue olor característico y un sabor caliente algo amargo.

Identificación:

A.- 5 mL de la solución 1:20 se añade 5 mL de NaOH TS. Hervir por pocos minutos, enfriar y acidificar con HCl 3N. La solución desarrolla opalescencia.

B.- Una mezcla Tween-Agua (60:40) forma una mezcla gelatinosa a temperatura ambiente o más baja.

Solubilidad: Soluble en agua, en la que se produce una solución incolora, soluble en alcohol. Insoluble en aceites minerales.

Densidad: 1.06 - 1.09 g/mL

pH: 6.0 - 8.0

Índice de Acidez: se pesa 10.0 g en un matraz y añadir 50 mL de alcohol neutralizado. Calentar casi a ebullición, agitando de vez en cuando a fondo mientras se calienta, enfriar adicionar 2 gotas de fenofaleína Ts, y titular con NaOH 0.1N Vs.

No requiere más que 4 mL de NaOH para determinar el Índice de Acidez.

#### 2.4.4.2.11. *Control de características Organolépticas y Físicas de los Geles*

Dentro de las características organolépticas (USP N° 35, 2012) se determina:

- **Aspecto:** se determina observando directamente contra luz la presencia de partículas y/o turbidez.
- **Color:** se toma una pequeña cantidad de cada gel en un vidrio reloj bien limpio y seco, observando su coloración.
- **Olor:** con la ayuda de una tira de papel secante, introducido en un extremo, distinguir el olor de cada gel

Dentro de las características físicas se determina:

- **Consistencia:** se toma una pequeña cantidad de gel con los dedos y aplicarlo suavemente en el dorso de la mano. Se aprecia la firmeza que presenta el gel.
- **pH:** previa la calibración del peachímetro, se procede a realizar la lectura del pH correspondiente a cada gel. El rango del pH debe estar en un rango de 6 a 7.5.
- **Ensayo de extensibilidad:** se pesa un gramo de cada gel, se coloca en el centro de la superficie del medidor de extensibilidad y se presiona con la superficie de vidrio a una temperatura de 35°C. El rango de la extensibilidad no debe ser mayor de 4.5 (USP N° 35).

#### 2.4.4.2.12. *Control Microbiológico de los Geles: Determinación de aerobios mesófilos, coliformes, mohos y levaduras en placas Petrifilm*

- Se esterilizó en la autoclave el material que se va a utilizar: Agua, espátulas, vasos de precipitación, puntas para pipetas y bajalenguas.
- Después de desinfectar se sometió a la Cámara de Flujo Laminar a luz UV durante 5 minutos.
- Se rotuló las cajas de Petrifilm para aerobios mesófilos, coliformes, mohos y levaduras.

- En seguida, en la cámara de Flujo Laminar se realizan diluciones de todos los geles; pesando 1g de cada gel de las dos variedades de chocho en 9mL de agua.
- Posteriormente se levantó la película que se encuentra en la parte superior de la placa, se coloca 1 mL de la dilución en el círculo que se encuentra en la parte inferior; se cierra cuidadosamente para evitar la entrada de burbujas.
- Se procedió a incubar a 35°C por 2 días las placas de aerobios mesófilos y coliformes, mohos y levaduras por 7 días.
- Finalmente se contó el número de colonias con ayuda del Contador de colonias (NEOFÁRMACO, 2014).

#### **2.4.5. COMPROBACIÓN DE LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS, ALCALOIDALES Y LIPÍDICOS DE DOS VARIEDADES DE CHOCHO (*Lupinus mutabilis* Sweet) SOBRE HERIDAS PRODUCIDAS EN RATONES.**

##### **2.4.5.1. Población de estudio**

Ratones (*Mus musculus*) machos de la cepa BALB / C de 2 a 3 meses.

Peso: 25-30g

Grupos de experimentación: 12

Animales por cada grupo: 3 ratones por cada grupo

Total: 45 ratones

- **GRUPO CONTROL NEGATIVO (BLANCO):** herida sin tratamiento, suero fisiológico.
- **GRUPO CONTROL NEGATIVO (BLANCO):** herida sin tratamiento, gel base solo con excipientes.



- **GRUPO CONTROL POSITIVO:** herida tratada con medicamento comercial BIAFINE® (Trolamina 0.67 g por 100g).
- **GRUPOS DE ESTUDIO:** herida tratada con geles de extractos Etanólicos, Alcaloidales y Lipídicos de las dos variedades de Chocho 450 y Andino a la concentración del 2% y 1%.

#### 2.4.5.2. *Evaluación actividad cicatrizante*

##### **INCISIÓN DE LA HERIDA**

- Primero se anestesió a cada animal, vía subdérmica.
- Luego se procedió a inducir la herida, en el dorso del animal, con la ayuda de un sacabocados, pinzas y tijera con una medida de 0.9 cm<sup>2</sup>.
- Posterior a esto, se aplicó los 12 tipos de geles a cada grupo de experimentación; vía tópica b.i.d. a la misma hora durante 14 días. Tiempo en el cual se midió el progreso del cierre de las heridas pasando dos días, hasta su completa cicatrización.
- Para determinar si existe diferencia estadísticamente significativa con los resultados obtenidos, se realizó el test estadístico de Anova un factor el cual se basa en la postulación de dos hipótesis. La hipótesis nula que dice que todos los grupos de estudio presentan la misma actividad cicatrizante y no se diferencian entre sí, y la hipótesis alternativa que menciona que al menos uno de los grupos de estudio presenta un comportamiento distinto a los demás en relación a su desempeño cicatrizante.
- Para determinar si se acepta la hipótesis nula o la alternativa observamos el P-valor si este es menor a 0.05 se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa estableciendo que si existe diferencia estadísticamente significativa en este punto de la investigación. Y entonces se aplica el post test Tukey.

## EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA

- Transcurridos los 14 días, se tomaron muestras de las heridas, realizando la fijación de la muestra en formol al 10 % por 24 h procesándose por la técnica clásica de inclusión en Parafina.
- Luego con la ayuda del micrótopo se realiza el corte de la muestra, para luego de ser ubicada en el baño de flotación y proceder con la coloración.
- La coloración se realiza con hematoxilina-eosina y se deja secar.
- Después con la ayuda del Entellan<sup>®</sup> y un cubre objetos de 20 a 40 cm, se monta y se procede a la lectura en el microscopio óptico, de las muestras del epitelio regenerado de los animales de experimentación (*Mus musculus*) con lente de 10x.

## **CAPÍTULO III**

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS, ALCALOIDALES Y LIPÍDICOS DE DOS VARIEDADES DE CHOCHO (*Lupinus mutabilis Sweet*): 450 ANDINO Y CRIOLLO**

Los extractos etanólicos de las dos variedades de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) 450 Andino y Criollo, fueron obtenidos por la técnica de maceración de la harina desengrasada de los mismos, con un porcentaje de rendimiento igual al 6.3%.

Los extractos alcaloidales fueron obtenidos por decocción de la harina de chocho y una posterior extracción líquido – líquido con éter de petróleo a un pH igual a 11, óptimo para la extracción de alcaloides. El porcentaje de rendimiento fue 4.05% de alcaloides del chocho 450 y 4.85% alcaloides del chocho Criollo.

Los extractos lipídicos fueron obtenidos por la técnica de maceración de la harina de las dos variedades de chocho y para la extracción se utilizó el Equipo de Soxhlet. El porcentaje de rendimiento fue de 16%.

#### **3.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS GRUPOS QUÍMICOS PRESENTES EN CADA EXTRACTO, MEDIANTE EL TAMIZAJE FITOQUÍMICO**

Los ensayos para la identificación cualitativa de los diferentes grupos químicos dieron los siguientes resultados:

**Cuadro 10:** Resultados del Tamizaje Fitoquímico

Ensayos	Grupos Químicos	Resultados
Dragendorff	Alcaloides	+++
Baljet	Coumarinas	++
Borntrager	Quinonas	-
Liebermann-Burchard	Triterpenos y/o esteroides	+++
Fehling	Azúcares reductores	+
Cloruro férrico	Taninos	++
Ninhidrina	Aminoácidos	++
Shinoda	Flavonoides	++

AUTOR: CASTILLO S, 2014

(+++): Abundante

(++): Moderado

(+): Escaso

(-): Negativo

Según los resultados obtenidos en el cuadro 10 se puede observar la presencia de varios grupos químicos importantes debido a sus usos y propiedades farmacológicas:

El ensayo de Dragendorff realizado en el extracto etanólico, lipídico y alcaloidal de las dos variedades de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) 450 Andino y Criollo revela la presencia abundante de alcaloides, compuestos sobresalientes que complementan el proceso de cicatrización debido a su efecto antimicrobiano (De la Vega, 1999)

Los responsables de la característica astringente del chocho, son los taninos, los cuales se encuentran en forma moderada (Galvez., et al., 2008). Al igual que los aminoácidos y flavonoides se presentan en cantidad moderada, importantes por su efecto antioxidante (Millán, 2014).

Lo que corrobora con la bibliografía de Cañigual, 2003 e INIAP, 2013; que indican la presencia de los mismos compuestos.

### **3.3. DETERMINACION DE TOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS, ALCALOIDALES Y LIPÍDICOS DE DOS VARIEDADES DE CHOCHO (*Lupinus mutabilis Sweet*): 450 ANDINO Y CRIOLLO.**

#### **3.3.1. BIOENSAYO DE TOXICIDAD DEL CHOCHO 450 Y CHOCHO CRIOLLO EN *Artemia salina*.**

Los resultados obtenidos del Bioensayo de Toxicidad del Chocho 450 Y Chocho Criollo en *Artemia salina*, aplicando el Test TRIMMED SPEARMAN-KARBER fueron:

- **Extractos etanólicos de chocho 450 y Criollo**

**Cuadro 11:** CL50 del Extracto etanólico de chocho 450

<b>CL50</b>	<b>209.08 ppm</b>
<b>Límite inferior</b>	96.50 ppm
<b>Límite superior</b>	452.62 ppm
<b>Porcentaje de confidencialidad</b>	95%

AUTOR: CASTILLO S, 2014

La CL50 del Extracto etanólico de chocho 450 es de 209.08 ppm; con un porcentaje de confiabilidad del 95% y un porcentaje de error del 10%. Clasificándolo como **Moderadamente tóxico**, según la Clasificación del CYTED.

**Cuadro 12:** Clasificación toxicidad según CYTED

I	Extremadamente tóxica	1 - 10	µg/mL
II	Altamente toxica	10 - 100	µg/mL
III	Moderadamente tóxica	100 - 500	µg/mL
IV	Ligeramente toxica	500 - 1000	µg/mL
V	Prácticamente no toxica	1000 - 1500	µg/mL
VI	Relativamente inocuo	> 1500	µg/mL

FUENTE: CYTED, 1995

**Cuadro 13:** CL50 del Extracto etanólico de chocho Criollo

<b>CL50</b>	<b>199.53 ppm</b>
<b>Límite inferior</b>	111.43 ppm
<b>Límite superior</b>	357.26 ppm.
<b>Porcentaje de confiabilidad</b>	95%

AUTOR: CASTILLO S, 2014

La CL50 del Extracto etanólico de chocho Criollo es de 199.53 ppm con un porcentaje de confiabilidad del 95%. Clasificándolo como **Moderadamente tóxico**, según la Clasificación del CYTED. Corroborando la bibliografía de Bussmann, W., 2011, en la cual se dice que si hay toxicidad, en los extractos etanólicos de la especie *Lupinus mutabilis*.

- **Extractos alcaloidales de chocho 450 y Criollo**

**Cuadro 14:** CL50 del Extracto alcaloidal de chocho 450

<b>CL50</b>	<b>562.34 ppm</b>
<b>Límite inferior</b>	140.58 ppm
<b>Límite superior</b>	2249.47 ppm
<b>Porcentaje de confidencialidad</b>	95%

AUTOR: CASTILLO S, 2014

La CL50 del Extracto alcaloidal de chocho Criollo es de 562.34 ppm, con un porcentaje de confidencialidad del 95% y un porcentaje de error del 40%.

El porcentaje de error tan alto se debe a la utilización de tan solo tres concentraciones para el Test de *Artemia salina*.

Clasificándolo como **Ligeramente tóxico**, según la Clasificación del CYTED.

**Cuadro 15:** CL50 del Extracto alcaloidal de chocho Criollo

<b>CL50</b>	<b>133.35 ppm</b>
<b>Límite inferior</b>	1.50 ppm
<b>Límite superior</b>	11845.60 ppm
<b>Porcentaje de confidencialidad</b>	95%

AUTOR: CASTILLO S, 2014

La CL50 del Extracto alcaloidal de chocho 450 es de 133.35 ppm. El porcentaje de confidencialidad es del 95% y un porcentaje de error del 40%. El porcentaje de error tan alto se debe a la utilización de tan solo tres concentraciones para el Test de *Artemia salina*.

Clasificándolo como **Moderadamente tóxico**, según la Clasificación del CYTED.

- **Extractos lipídicos de chocho 450 y Criollo**

**Cuadro 16:** CL50 del Extracto lipídico de chocho 450

<b>CL50</b>	<b>1000 ppm</b>
<b>Porcentaje de confidencialidad</b>	95%

AUTOR: CASTILLO S, 2014

La CL50 del Extracto lipídico de chocho 450 es de 1000ppm, con un porcentaje de confidencialidad del 95% y un porcentaje de error del 50%.

El porcentaje de error tan alto se debe a la utilización de tan solo tres concentraciones para el Test de *Artemia salina*.

Clasificándolo como ***Prácticamente no tóxico***, según la Clasificación del CYTED.

**Cuadro 17:** CL50 del Extracto lipídico de chocho Criollo

<b>CL50</b>	<b>1000 ppm</b>
<b>Porcentaje de confidencialidad</b>	95%

AUTOR: CASTILLO S, 2014

La CL50 del Extracto lipídico de chocho Criollo es de 1000ppm, con un porcentaje de confidencialidad del 95% y un porcentaje de error del 50%. El porcentaje de error tan alto se debe a la utilización de tan solo tres concentraciones para el Test de *Artemia salina*.

Clasificándolo como ***Prácticamente no tóxico***, según la Clasificación del CYTED.



### 3.3.2. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL 50(DL50) DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS, ALCALOIDALES Y LIPÍDICOS DEL CHOCHO 450 Y CHOCHO CRIOLLO EN RATONES

#### 3.3.2.1. Determinación De La Dosis Letal 50(DL50) De Los Extractos Etanólicos Del Chocho 450 Y Chocho Criollo

**CUADRO 18:** Evaluación de la Toxicidad Aguda de los extractos etanólicos del chocho 450 y chocho criollo

<b>MUESTRA</b>	<b>DOSIS (mg/kg)</b>	<b>MUERTOS</b>	<b>VIVOS</b>	<b>% MORTALIDAD</b>
<b>EX. ETANOLICO C.450</b>	5000	3	0	100
	2500	3	0	100
	1250	0	3	0
	625	0	3	0
<b>EX. ETANOLICO CRIOLLO</b>	5000	3	0	100
	2500	3	0	100
	1250	0	3	0
	625	0	3	0

AUTOR: CASTILLO S, 2014

#### RESULTADOS:

- La dosis prueba de 5000 y 2500 mg/kg fueron letales para todo el grupo de animales de experimentación en un tiempo promedio de 3 minutos y 5 minutos respectivamente.
- El 83% de la población se presentó pasivo con una disminución de la actividad motora, en la primera hora post administración de los extractos etanólicos.
- El 67% de la población presentó disminución de la actividad prensil, en la primera hora post administración de los extractos etanólicos..

- En cuanto a los demás parámetros como ataxia, pérdida del reflejo de enderezamiento, erección de la cola, pilo erección, mucosas pálidas, mucosas cianóticas no se observaron.
- Por otro lado, los animales de experimentación no presentaron alteración en los parámetros de: reflejo corneal, micción, equilibrio, actividad neuromuscular (test de chimenea). Lo mismo sucedió con el peso de cada animal, no hubo cambio significativo durante los 7 días.
- Como resultado de la disección y comparación de los órganos de los grupos con tratamiento y los órganos del blanco, se obtuvo los datos que se muestran en el CUADRO 19.

**CUADRO 19:** Comparación de los órganos de los grupos con tratamiento y los órganos del blanco, de los extractos etanólicos del chocho 450 y chocho criollo

	<b>DOSIS</b> <i>(mg/kg)</i>	<b>PESO(g)</b>			<b>CARACTERÍSTICAS</b>
<b>TRATAMIENTO</b>		<b>BAZO</b>	<b>RIÑONES</b>	<b>HÍGADO</b>	<b>ESTÓMAGO</b>
<b>BLANCO</b>		<b>0.1</b>	<b>0.8</b>	<b>2.0</b>	<b>ROSADO SIN INFLAMACIÓN</b>
<b>EX.ETA.C450</b>	1250	0.1	0.6	2.1	Rosado sin inflamación
	625	0.1	0.6	2.1	Rosado sin inflamación
<b>EX.ETA.CC</b>	1250	0.2	0.6	2.1	Rosado sin inflamación
	625	0.2	0.7	2.1	Rosado sin inflamación

AUTOR: CASTILLO S, 2014

En el que se observa que a nivel del estómago su coloración es normal no existe inflamación ni irritación.

De igual manera, el peso y características macroscópicas de los riñones, hígado y bazo no se ven alterados. Por lo que no se evidencia toxicidad significativa a nivel hepático, renal y esplénico.

Comparado con el criterio de Williams, 1985; los extractos etanólicos de las dos variedades de chocho, son **Ligeramente tóxicos**. Demostrando toxicidad al igual que el Bioensayo en *Artemia salina* y corroborando la bibliografía de Bussmann, W., 2011, en la cual se dice que los extractos etanólicos de chocho si son tóxicos.

**CUADRO 20: Criterio de Williams, 1985**

CLASIFICACIÓN DE TÓXICOS	DL 50 mg/kg (ratones vía oral)
Extremadamente tóxica	$\leq 1$
Altamente toxica	$\leq 50$
Moderadamente tóxica	$\leq 500$
Ligeramente toxica	$\leq 5\,000$
Prácticamente no toxica	$\leq 15\,000$
Relativamente inocuo	$\geq 15\,000$

FUENTE: CYTED, 1995

### 3.3.2.2. Determinación De La Dosis Letal 50<sub>(DL50)</sub> De Los Extractos Alcaloidales Del Chocho 450 Y Chocho Criollo

**CUADRO 21:** Evaluación de la Toxicidad Aguda de los extractos alcaloidales del chocho 450 y chocho criollo

MUESTRA	DOSIS (mg/kg)	MUERTOS	VIVOS	% MORTALIDAD
EX. ALCALOIDAL C450	5000	3	0	100
	2500	0	3	0
	1250	0	3	0
	625	0	3	0
EX. ALCALOIDAL CRIOLLO	5000	3	0	100
	2500	0	3	0
	1250	0	3	0
	625	0	3	0

AUTOR: CASTILLO S, 2014

## RESULTADOS:

- La dosis prueba de 5000 mg/kg fue letal para todo el grupo de animales de experimentación en un tiempo de 9 a 11 minutos.
- El 89% de la población se presentó muy pasivo con una disminución de la actividad motora, disminución de la actividad prensil y una mínima alteración del equilibrio en la primera hora post administración de los extractos alcaloidales. Pero a las 3 horas post administración, estos parámetros se presentaron normales.
- En cuanto, a los demás parámetros como ataxia, pérdida del reflejo de enderezamiento, erección de la cola, pilo erección, mucosas pálidas, mucosas cianóticas no se observaron.
- Por otro lado, los animales de experimentación no presentaron alteración en los parámetros de: reflejo corneal, micción, actividad neuromuscular (test de chimenea). Lo mismo sucedió con el peso de cada animal, no hubo cambio significado durante los 7 días. }
- Como resultado de la disección y comparación de los órganos de los grupos con tratamiento y los órganos del blanco, se obtuvo los datos que se muestran en el CUADRO 22.

**CUADRO 22:** Comparación de los órganos de los grupos con tratamiento y los órganos del blanco, de los extractos alcaloidales del chocho 450 y chocho criollo

TRATAMIENTO	DOSIS (mg/kg)	PESO (g)			CARACTERÍSTICAS
		BAZO	RINONES	HIGADO	ESTÓMAGO
BLANCO		0.1	0.6	2.1	ROSADO SIN INFLAMACIÓN
EX.AL.C450	2500	0.1	0.7	2.1	Rosado sin inflamación
	1250	0.1	0.7	2.1	Rosado sin inflamación
	625	0.1	0.5	1.8	Rosado sin inflamación
EX.AL.C CRIOLLO	2500	0.2	0.5	2.1	Rosado sin inflamación
	1250	0.1	0.5	2.1	Rosado sin inflamación
	625	0.1	0.5	1.9	Rosado sin inflamación

AUTOR: CASTILLO S, 2014

En el que se observa que a nivel del estómago su coloración es normal no existe inflamación ni irritación.

De igual manera, el peso y características macroscópicas de los riñones, hígado y bazo no se ven alterados. Por lo que no se evidencia toxicidad significativa a nivel hepático, renal y esplénico.

Comparado con el criterio de Williams, 1985; los extractos alcaloidales son **Ligeramente tóxicos.**

3.3.2.3. *Determinación De La Dosis Letal 50<sub>(DL50)</sub> De Los Extractos Lipídicos Del Chocho 450 Y Chocho Criollo.*

**CUADRO 23:** Evaluación de la Toxicidad Aguda de los extractos lipídicos del chocho 450 y chocho criollo

<b>MUESTRA</b>	<b>DOSIS (mL/kg)</b>	<b>MUERTOS</b>	<b>VIVOS</b>	<b>% MORTALIDAD</b>
EX.LI.C450	128	0	3	0
	96	0	3	0
	64	0	3	0
	32	0	3	0
	16	0	3	0
	8	0	3	0
EX.LI.CC	128	0	3	0
	96	0	3	0
	64	0	3	0
	32	0	3	0
	16	0	3	0
	8	0	3	0

AUTOR: CASTILLO S, 2014

**RESULTADOS:**

- Ninguna de las dosis prueba fueron letales para todos los grupos de animales de experimentación.
- El 89% de la población presentaron ataxia, taquipnea, letargia, pérdida del reflejo de enderezamiento, disminución de la actividad motora y disminución de la actividad prensil en la primera hora post administración de los extractos lipídicos.
- A las 6 horas, los ratones de los grupos de las DOSIS ALTAS de 128, 96, 64 y 32 mL/kg presentaron DIARREA hasta las 12 horas. Mientras que a DOSIS BAJAS de 16 y 8 mL/kg no se observó diarrea.
- En cuanto, a los demás parámetros como erección de la cola, pilo erección, mucosas pálidas, mucosas cianóticas no se observaron.

- Por otro lado, los animales de experimentación no presentaron alteración en los parámetros de: reflejo corneal, micción, actividad neuromuscular (test de chimenea). Lo mismo sucedió con el peso de cada animal, no hubo cambio significativo durante los 7 días.
- Como resultado de la disección y comparación de los órganos de los grupos con tratamiento y los órganos del blanco, se obtuvo los datos que se muestran en el CUADRO 24.

**CUADRO 24:** Comparación de los órganos de los grupos con tratamiento y los órganos del blanco, de los extractos lipídicos del chocho 450 y chocho criollo

	<i><b>DOSIS</b></i> <i><b>(mg/kg)</b></i>	<i><b>PESO(g)</b></i>			<i><b>CARACTERÍSTICAS</b></i>
<i><b>TRATAMIENTO</b></i>		<i><b>BAZO</b></i>	<i><b>RIÑONES</b></i>	<i><b>HÍGADO</b></i>	<i><b>ESTÓMAGO</b></i>
<i><b>BLANCO</b></i>		<i><b>0.1</b></i>	<i><b>0.6</b></i>	<i><b>2.5</b></i>	<i><b>ROSADO SIN INFLAMACIÓN</b></i>
<b>EX. LIPIDICO C. 450</b>	128	0.1	0.5	2.2	Rosado sin inflamación
	96	0.1	0.6	2.1	Rosado sin inflamación
	64	0.2	0.6	2.2	Rosado sin inflamación
	32	0.1	0.5	1.9	Rosado sin inflamación
	16	0.2	0.5	2.2	Rosado sin inflamación
	8	0.1	0.5	1.7	Rosado sin inflamación
<b>EX. LIPIDICO C. CRIOLLO</b>	128	0.1	0.5	2.2	Rosado sin inflamación
	96	0.1	0.6	2.2	Rosado sin inflamación
	64	0.2	0.6	2.4	Rosado sin inflamación
	32	0.1	0.5	2.5	Rosado sin inflamación
	16	0.1	0.4	2.3	Rosado sin inflamación
	8	0.1	0.5	1.8	Rosado sin inflamación

CASTILLO S, 2014

En el que se observa que a nivel del estómago su coloración es normal no existe inflamación ni irritación.

De igual manera, el peso y características macroscópicas de los riñones, hígado y bazo no se ven alterados. Por lo que no se evidencia toxicidad significativa a nivel hepático, renal y esplénico.

Los extractos lipídicos no son **tóxicos**, debido a que a ninguna dosis prueba los animales de experimentación murieron.

### **3.3.3. ENSAYO DE IRRITABILIDAD DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS, ALCALOIDALES Y LIPÍDICOS DEL CHOCHO 450 Y CHOCHO CRIOLLO**

Los extractos etanólicos, alcaloidales y lipídicos de las dos variedades de chocho probados en los dorsos depilados de los animales, no produjeron enrojecimiento, ni edema, ni erupciones cutáneas a los 30 minutos, 6 y 24 horas.

### **3.4. ELABORACIÓN DE GELES DE LAS DOS VARIEDADES DE *Lupinus mutabilis Sweet* Y CONTROL DE CALIDAD DE LOS MISMOS**

La formulación de los geles fue:

#### **3.4.1. Gel con extracto etanólico de Chocho 450 y Criollo al 2% y 1 %**

#### **DESCRIPCIÓN:**

Gel de color ámbar y amarillo respectivamente. Cada 100 g contiene 2 g de extracto etanólico de Chocho 450 y Criollo en concentración del 2%. Y Cada 100 g contiene 1 g de extracto etanólico de Chocho 450 y Criollo en concentración del 1%.

#### **FORMULACIÓN**

Para 100g de gel:

- 90mL de agua purificada



- 0.2g de Goma xanthan
- 0.8 g de Carbopol
- 2.4g de Dimeticona
- 0.4 g de TEA
- 0.090g de Metil parabeno sódico
- 0.010g de Propil parabeno sódico
- 2g(1g) de extracto Etanólico de chocho 450 y Criollo
- 1g de glicerina

#### **3.4.2. Gel con extracto alcaloidal de Chocho 450 y Criollo al 2% y 1 %**

##### **DESCRIPCIÓN:**

Geles de color transparente. Cada 100 g contiene 2 g de extracto alcaloidal de Chocho 450 y Criollo en concentración del 2%. Y Cada 100 g contiene 1 g de extracto alcaloidal de Chocho 450 y Criollo en concentración del 1%.

##### **FORMULACIÓN**

Para 100g de gel:

- 90mL de agua purificada
- 0.2g de Goma xanthan
- 0.8 g de Carbopol
- 2.4g de Dimeticona
- 0.4 g de TEA
- 0.090g de Metil parabeno sódico
- 0.010g de Propil parabeno sódico
- 2g(1g) de extracto Alcaloidal de chocho 450 y Criollo
- 1g de glicerina

### **3.4.3. Gel con extracto lipídico de Chocho 450 y Criollo al 2% y 1 %**

#### **DESCRIPCIÓN:**

Gel de color crema y blanco respectivamente. Cada 100 g contiene 2 g de extracto lipídico de Chocho 450 y Criollo en concentración del 2%. Y Cada 100 g contiene 1 g de extracto lipídico de Chocho 450 y Criollo en concentración del 1%.

#### **FORMULACIÓN:**

Para 100g de gel:

##### **Fase Acuosa**

- 90mL de agua
- 0.2g de Goma xanthan
- 0.8 g de Carbopol
- 2.4 g de Dimeticona
- 0.090g de Metil parabeno sódico
- 0.010g de Propil parabeno sódico
- 0.4 g de TEA

##### **Fase Oleosa**

- 2g de extracto Lipídico de chocho 450 y Criollo
- 0.25g de Croduret
- 0.4g de Tween 80
- 1g de glicerina (VER ANEXO 5)

### **3.5. CONTROL DE CALIDAD DE LOS GELES**

#### **3.5.1. Control de calidad de los excipientes**

Para el control de calidad de los excipientes, se siguió parámetros validados por la USP, los mismos que permiten establecer si cumple o no con los requisitos de calidad.

### CUADRO 25: Agua Purificada

ENSAYOS	ESPECIFICACIONES		RESULTADOS
Descripción	Líquido transparente, incoloro e inodoro.		<b>Conforme</b>
Ph	5.0 - 7.5		<b>6,14</b>
Cloruros	No debe aparecer opalescencia		<b>Conforme</b>
Sulfatos	No debe presentar turbidez.		<b>Conforme</b>
Calcio	No debe presentar turbidez.		<b>Conforme</b>
Sólidos Totales	El total de residuo no debe ser mayor a 1 mg		<b>0.82 mg</b>
Microbiología	Aerobios totales	<10 ufc/g	<b>Conforme</b>
	Mohos y levaduras	Ausencia	<b>Conforme</b>
	Patógenos	Ausencia	<b>Ausente</b>

FUENTE: NEOFARMACO

En el cuadro 25, se puede observar que el Agua Purificada si cumple con la especificaciones establecida en la USP 35, 2012.

### CUADRO 26: Carbopol

ENSAYOS	ESPECIFICACIONES		RESULTADOS
Descripción	Polvo blanco, de olor tenue. Higroscópico.		<b>Conforme</b>
Solubilidad	Soluble en agua, en alcohol.		<b>Conforme</b>
Identificación	Gel sumamente viscoso.		<b>Positiva</b>
Pérdida por secado	No pierde más del 2.0% de su peso		<b>0,89%</b>
Microbiología	Aerobios totales	<100 ufc/g	<b>Conforme</b>
	Mohos y levaduras	<10 ufc/g	<b>Conforme</b>
	Patógenos	Ausencia	<b>Ausente</b>

FUENTE: NEOFARMACO

En el cuadro 26, se puede observar que el Carbopol si cumple con la especificaciones establecida en la USP 25, 2007.

**CUADRO 27: Croduret**

ENSAYOS	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
Descripción	Mezcla semisólida amarillenta.	<b>Conforme</b>
Solubilidad	Soluble en agua, etanol y acetona.	<b>Conforme</b>
Índice de Saponificación	$IS = \frac{(VB-VM) \times N \times 56.1}{PESO\ DE\ LA\ MUESTRA}$ <p> DONDE:  VB = volumen de HCl 0,5 N gastado para titular el blanco  VM = volumen de HCl 0,5 N gastado para titular la muestra </p>	<b>Entre 50.0 a 60.0 mgKOH/g</b>

FUENTE: NEOFARMACO

En el cuadro 27, se puede observar que el Croduret si cumple con la especificaciones establecida en la USP 25, 2007.

**CUADRO 28: Dimeticona**

ENSAYOS	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
Descripción	Líquido claro con un color ligeramente ámbar de olor característico	<b>Conforme</b>
Densidad	0.964 - 0.972 g/mL	<b>0.978 g/mL</b>
Pérdida por secado	1 g de muestra a 105°C. Máximo 0.3%	<b>0,29%</b>

FUENTE: NEOFARMACO

En el cuadro 27, se puede observar que la Dimeticona si cumple con la especificaciones establecida en la USP 28, 2007.

**CUADRO 29: Glicerina**

ENSAYOS	ESPECIFICACIONES		RESULTADOS
Descripción	Líquido siruposo claro e incoloro, de sabor dulce y olor característico.		Conforme
Color	No es más oscura en comparación a un estándar (0,4 mL de cloruro férrico en 50 mL de agua).		Conforme
Identificación	Se forma un anillo azul en la interface de los líquidos. Dejar reposar 10 minutos. El color no se difunde a la capa inferior.		Positivo
Solubilidad	Miscible con agua, alcohol y metanol. Insoluble en cloroformo y éter.		Conforme
Densidad	No menor de 1.249 g/mL		1.283 g/mL
Cloruros	No debe haber presencia de precipitado blanco.		Conforme
Sulfatos	No debe haber presencia de precipitado blanco.		Conforme
Microbiología	Aerobios totales	<100 ufc/g	Conforme
	Mohos y levaduras	<10 ufc/g	Conforme
	Patógenos	Ausencia	Ausente

FUENTE: NEOFARMACO

En el cuadro 29, se puede observar que la Glicerina si cumple con la especificaciones establecida en la USP 25, 2007.

**CUADRO 30: Goma Xanthan**

ENSAYOS	ESPECIFICACIONES		RESULTADOS
Descripción	Polvo fino de color blanco a cremoso; el polvo es inodoro e insípido		Conforme
Solubilidad	Soluble en agua fría o caliente dando soluciones altamente viscosas		Conforme
pH	La solución acuosa es neutra al tornasol.		7
Pérdida por secado	No pierde más del 15% de su peso.		8,95%
Microbiología	Aerobios totales	<100 ufc/g	Conforme
	Mohos y levaduras	<10 ufc/g	Conforme
	Patógenos	Ausencia	Ausente

FUENTE: NEOFARMACO

En el cuadro 30, se puede observar que la Goma Xanthan si cumple con la especificaciones establecida en la USP 25, 2007.

**CUADRO 31: Metil parabeno sódico**

<b>ENSAYOS</b>	<b>ESPECIFICACIONES</b>		<b>RESULTADOS</b>
Descripción	Polvo cristalino blanco de olor característico y sabor quemante leve		<b>Conforme</b>
Solubilidad	Fácilmente soluble en alcohol y éter. Ligeramente soluble en agua y benceno.		<b>Conforme</b>
pH	Entre 9.5 y 10.5		<b>10,3</b>
Punto de Fusión	125 - 128°C		<b>126.1°C</b>
Microbiología	Aerobios totales	<100 ufc/g	<b>Conforme</b>
	Mohos y levaduras	<10 ufc/g	<b>Conforme</b>
	Patógenos	Ausencia	<b>Ausente</b>

FUENTE: NEOFARMACO

En el cuadro 31, se puede observar que el Metil parabeno sódico si cumple con la especificaciones establecida en la USP 25, 2007.

**CUADRO 32: Propil parabeno sódico**

<b>ENSAYOS</b>	<b>ESPECIFICACIONES</b>		<b>RESULTADOS</b>
Descripción	Polvo cristalino blanco, con olor característico. Higroscópico.		<b>Conforme</b>
Solubilidad	Soluble en agua y alcohol Insoluble en aceites		<b>Conforme</b>
pH	Entre 9.5 y 10.5 en una solución 1:100		<b>10.51</b>
Microbiología	Aerobios totales	<100 ufc/g	<b>Conforme</b>
	Mohos y levaduras	<10 ufc/g	<b>Conforme</b>
	Patógenos	Ausencia	<b>Ausente</b>

FUENTE: NEOFARMACO

En el cuadro 32, se puede observar que el Propil parabeno sódico si cumple con la especificaciones establecida en la USP 25, 2007.

**CUADRO 33: Trietanolamina (TEA)**

ENSAYOS	ESPECIFICACIONES		RESULTADOS
Descripción	Líquido incoloro, viscoso que tiene un ligero olor amoniacal. Se torna café por exposición a la luz y aire		<b>Conforme</b>
Solubilidad	Miscible con agua y alcohol, soluble en cloroformo, y ligeramente soluble en éter o benceno.		<b>Conforme</b>
Identificación	A. Cambia el color del papel tornasol rojo a azul. B. Temperatura de fusión de 178 ° C		<b>Positivo Positivo</b>
Microbiología	Aerobios totales	<100 ufc/g	<b>Conforme</b>
	Mohos y levaduras	<10 ufc/g	<b>Conforme</b>
	Patógenos	Ausencia	<b>Ausente</b>

FUENTE: NEOFARMACO

En el cuadro 33, se puede observar que la TEA si cumple con la especificaciones establecida en la USP 25, 2007.

**CUADRO 34: Tween 80**

ENSAYOS	ESPECIFICACIONES		RESULTADOS
Descripción	Líquido oleoso de color amarillo, tiene un tenue olor característico y un sabor algo amargo.		<b>Conforme</b>
Solubilidad	Soluble en agua, en la que se produce una solución incolora, soluble en alcohol. Insoluble en aceites minerales.		<b>Conforme</b>
Identificación	A. La solución desarrolla opalescencia. B. Una mezcla Tween-Agua (60:40) forma una mezcla gelatinosa a temperatura ambiente		<b>Positivo Positivo</b>
Densidad	1.06 - 1.09 g/mL		<b>1.061 g/mL</b>
pH	6.0 - 8.0		<b>7,99</b>
Índice de Acidez	No requiere más que 4 mL de NaOH para determinar el Índice de Acidez		<b>1,05%</b>

FUENTE: NEOFARMACO

En el cuadro 33, se puede observar que el Tween 80 si cumple con la especificaciones establecida en la USP 30, 2007.

### 3.5.2. Control de características Organolépticas y Físicas de los Geles

**CUADRO 35:** Características Organolépticas y Físicas de los Geles con extractos etanólicos, alcaloidales y lipídicos al 2% y 1 %.

GEL	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G 12
CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS												
Aspecto	Gel homogéneo untuoso al tacto, libre de grumos											
Color	Ámbar oscuro	Ámbar claro	Amarillo oscuro	Amarillo claro	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	Beige oscuro	Beige claro	Crema oscuro	Crema claro
Olor	Característico del chocho y de sus ingredientes											
CARACTERÍSTICAS FÍSICAS												
pH	5.55	5.45	5.59	5.54	5.59	5.55	5.57	5.51	5.91	5.35	5.97	4.37
Extensibilidad	3.6	3.9	3.4	4.0	3.5	3.6	3.5	3.3	3.9	3.5	3.7	3.7
Consistencia	Buena consistencia											

AUTOR: CASTILLO S, 2014

- G1 = Gel con extracto etanólico de chocho 450 al 2%
- G2 = Gel con extracto etanólico de chocho 450 al 1 %
- G3 = Gel con extracto etanólico de chocho criollo al 2%
- G4 = Gel con extracto etanólico de chocho criollo al 1 %
- G5 = Gel con extracto alcaloidal de chocho 450 al 2%
- G6 = Gel con extracto alcaloidal de chocho 450 al 1 %
- G7 = Gel con extracto alcaloidal de chocho criollo al 2%
- G8 = Gel con extracto alcaloidal de chocho criollo al 1 %
- G9 = Gel con extracto lipídico de chocho 450 al 2%
- G10 = Gel con extracto lipídico de chocho 450 al 1 %
- G11 = Gel con extracto lipídico de chocho criollo al 2%
- G12 = Gel con extracto lipídico de chocho criollo al 1 %



En el CUADRO 35, se puede apreciar que el color de cada gel varía de acuerdo con el color propio de los extractos etanólicos, alcaloidales y lipídicos de las dos variedades de chocho 450 y Criollo y también difiere el color de acuerdo a las concentraciones del 2% y 1%.

En cuanto al olor de cada gel, es característico al olor del chocho y de todos sus ingredientes.

Además todos los geles poseen buena consistencia observándose homogéneos, untuosos y libres de grumos.

En cuanto al pH, todos los geles presentan pH ligeramente ácido, encontrándose dentro del rango del pH de la piel que es 5 a 5.5; lo que demuestra la afinidad con la piel, por lo que al ser aplicados sobre las heridas no produjo hipersensibilidad ni reacciones adversas.

Por otro lado, en el ensayo de extensibilidad se determinó que todos geles cumplen con las especificaciones de la USP 35, 2012; probando la capacidad adecuada, para ser aplicados y distribuidos uniformemente en la piel. (VER ANEXO 6).

### ***3.5.3. Control Microbiológico de los Geles: Determinación de aerobios mesófilos, coliformes, mohos y levaduras en placas Petrifilm***

Los parámetros analizados en el Control Microbiológico de los Geles, indican:

Aerobios mesófilos = Parámetro general de higiene

Coliformes = Contaminación fecal

Mohos y levaduras= Micotoxigenicidad potencial

UFC= Unidades formadoras de Colonias.

**CUADRO 36:** Control Microbiológico de los Geles con extractos  
etanólicos, alcaloidales y lipídicos al 2% y 1 %.

GEL	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G 12	USP 35
	<b>PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS</b>												
<b>Aerobios totales</b>	Ausencia												< 100 ufc/mL
<b>Mohos y levaduras</b>	Ausencia												< 10 ufc/mL
<b>Coliformes</b>	Ausencia												Ausentes

AUTOR: CASTILLO S, 2014

- G1 = Gel con extracto etanólico de chocho 450 al 2%
- G2 = Gel con extracto etanólico de chocho 450 al 1 %
- G3 = Gel con extracto etanólico de chocho criollo al 2%
- G4 = Gel con extracto etanólico de chocho criollo al 1 %
- G5 = Gel con extracto alcaloidal de chocho 450 al 2%
- G6 = Gel con extracto alcaloidal de chocho 450 al 1 %
- G7 = Gel con extracto alcaloidal de chocho criollo al 2%
- G8 = Gel con extracto alcaloidal de chocho criollo al 1 %
- G9 = Gel con extracto lipídico de chocho 450 al 2%
- G10 = Gel con extracto lipídico de chocho 450 al 1 %
- G11 = Gel con extracto lipídico de chocho criollo al 2%
- G12 = Gel con extracto lipídico de chocho criollo al 1 %

Como demuestra el CUADRO 36, los geles con extractos etanólicos, alcaloidales y lipídicos de las dos variedades de chocho a las concentraciones del 2 % y 1%, no existe crecimiento microbiano; cerciorando la inocuidad de los mismos, para su aplicación segura (VER ANEXO 7 y 8).

### 3.6. COMPROBACIÓN DE LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS, ALCALOIDALES Y LIPÍDICOS DE DOS VARIEDADES DE CHOCHO (*Lupinus mutabilis Sweet*) SOBRE HERIDAS PRODUCIDAS EN RATONES.

#### 3.6.1. Evaluación Actividad Cicatrizante

**CUADRO 37:** ANÁLISIS ESTADÍSTICO ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICO, LIPÍDICO Y ALCALOIDAL DEL CHOCHO 450 Y CRIOLLO (*Lupinus mutabilis Sweet*); DESPUES DE TRES DÍAS DE SU ADMINISTRACIÓN. ANOVA UN FACTOR COMPARACIONES MÚLTIPLES. MÉTODO: TUKEY HSD AL 95.00%.

GRUPOS	ÁREA HERIDA cm <sup>2</sup>
ETA 450 2%	0.533 ± 0.104
ETA 450 1%	0.566 ± 0.160
ETA CRIOLLO 2%	0.700 ± 0.000
ETA CRIOLLO 1%	0.616 ± 0.104
LI 450 2%	0.633 ± 0.189
LI 450 1%	0.650 ± 0.173
LI CRIOLLO 1%	0.633 ± 0.115
LI CRIOLLO 2%	0.693 ± 0.183
AL 450 2%	0.703 ± 0.200
AL 450 1%	0.633 ± 0.577
AL CRIOLLO 2%	0.536 ± 0.551
AL CRIOLLO 1 %	0.616 ± 0.028
BLANCO GEL SOLO EXCI.	0.783 ± 0.028
BLANCO SIN NADA	0.800 ± 0.050
TROLAMINA	0.773 ± 0.025

N= 3, media ± Desviación estándar. p – valor 0.1742

AUTOR: CASTILLO S, 2014

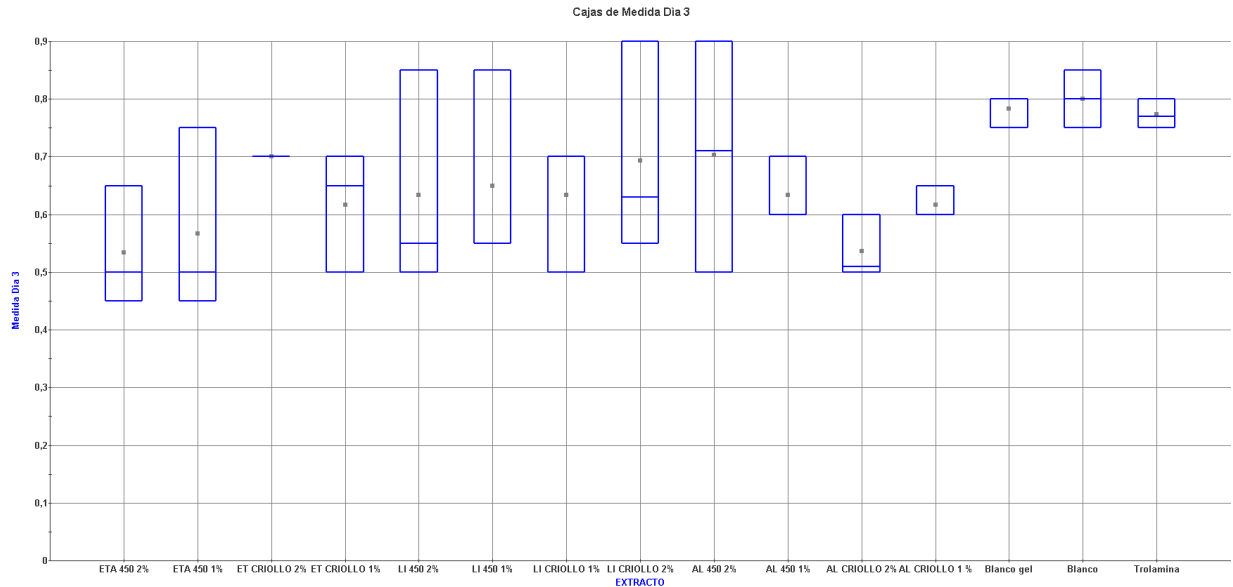
Después de tres días de la administración de los extractos para evaluar su actividad cicatrizante se comparó las dimensiones de las heridas inducidas en los animales de experimentación.

Observando que el extracto con menos efecto cicatrizante presente es el extracto alcaloidal 450 al 2% presentando una herida de  $0.703 \text{ cm}^2$ . Por otra parte el extracto con mayor actividad cicatrizante evidenciada es el etanólico 450 al 2% que presenta una herida de  $0.533 \text{ cm}^2$ .

En este punto de la investigación este extracto presenta un mejor comportamiento que la Trolamina cuyos animales de experimentación presentan una herida de  $0.773 \text{ cm}^2$  promedio.

La reproducibilidad y homogeneidad de los datos recolectados está garantizada en relación a los valores de medida de dispersión que presentan cada grupo sus valores de varianza y desviación típica son mínimos con lo cual se respalda la presente investigación. El P-valor es de 0.174 mucho mayor a 0.05 con lo cual se acepta la hipótesis nula y en este punto de la investigación no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio.

**GRÁFICO 6:** CAJAS DE MEDIAS Y DESVIACIÓN DE ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICO, LIPÍDICO Y ALCALOIDAL DEL CHOCHO 450 Y CRIOLLO (*Lupinus mutabilis* Sweet); DESPUES DE TRES DÍAS DE SU ADMINISTRACIÓN



AUTOR: CASTILLO S, 2014

En el gráfico de cajas se observa el comportamiento de los extractos en relación a su actividad cicatrizante y la dispersión de los datos al interior de cada grupo de estudio, mientras más pequeña sea la caja mayor reproducibilidad y homogeneidad en los datos recolectados para ese grupo se evidencia.

En este grafico todos los grupos presentan un comportamiento casi similar en relación a la actividad cicatrizante se encuentran casi a la misma altura de evolución de la herida en relación a su dimensión. Se confirma gráficamente que el extracto alcaloidal 450 al 2% es el que menos actividad cicatrizante presenta en tanto que el extracto etanólico 450 al 2% es el que mejor actividad cicatrizante presenta incluso superando el desempeño de la Trolamina.

**CUADRO 38:** ANÁLISIS ESTADÍSTICO ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICO, LIPÍDICO Y ALCALOIDAL DEL CHOCHO 450 Y CRIOLLO (*Lupinus mutabilis* Sweet); DESPUES DE CINCO DÍAS DE SU ADMINISTRACIÓN. ANOVA UN FACTOR COMPARACIONES MÚLTIPLES. MÉTODO: TUKEY HSD AL 95.00%.

GRUPOS	ÁREA HERIDA cm <sup>2</sup>	GRUPOS HOMOGÉNEOS
ETA 450 2%	0.466 ± 0.115	X <sub>b</sub>
ETA 450 1%	0.483 ± 0.189	X <sub>b</sub>
ETA CRIOLLO 2%	0.500 ± 0.000	X <sub>b</sub>
ETA CRIOLLO 1%	0.500 ± 0.100	X <sub>b</sub>
LI 450 2%	0.483 ± 0.189	X <sub>b</sub>
LI 450 1%	0.483 ± 0.104	X <sub>b</sub>
LI CRIOLLO 1%	0.530 ± 0.026	X <sub>b</sub>
LI CRIOLLO 2%	0.550 ± 0.132	X <sub>b</sub>
AL 450 2%	0.533 ± 0.154	X <sub>b</sub>
AL 450 1%	0.433 ± 0.057	X <sub>a</sub>
AL CRIOLLO 2%	0.450 ± 0.050	X <sub>b</sub>
AL CRIOLLO 1 %	0.500 ± 0.000	X <sub>b</sub>
BLANCO GEL SOLO EXCI.	0.766 ± 0.028	X <sub>b</sub>
BLANCO SIN NADA	0.633 ± 0.028	X <sub>c</sub>
TROLAMINA	0.443 ± 0.011	X <sub>a</sub>

N= 3, media ± Desviación estándar. p – valor 0. 0436

AUTOR: CASTILLO S, 2014

Transcurridos cinco días de administración de los extractos, el extracto alcaloidal 450 2% ha disminuido el tamaño de la herida a 0.533 cm<sup>2</sup> este extracto es el que menor actividad cicatrizante demuestra en este punto de la investigación.

En tanto que el tamaño de la herida en el grupo del extracto alcaloidal 450 al 1% disminuyo hasta 0.4333 cm<sup>2</sup> superando el desempeño de la Trolamina que disminuyo el tamaño de la herida hasta 0.4433 cm<sup>2</sup>.

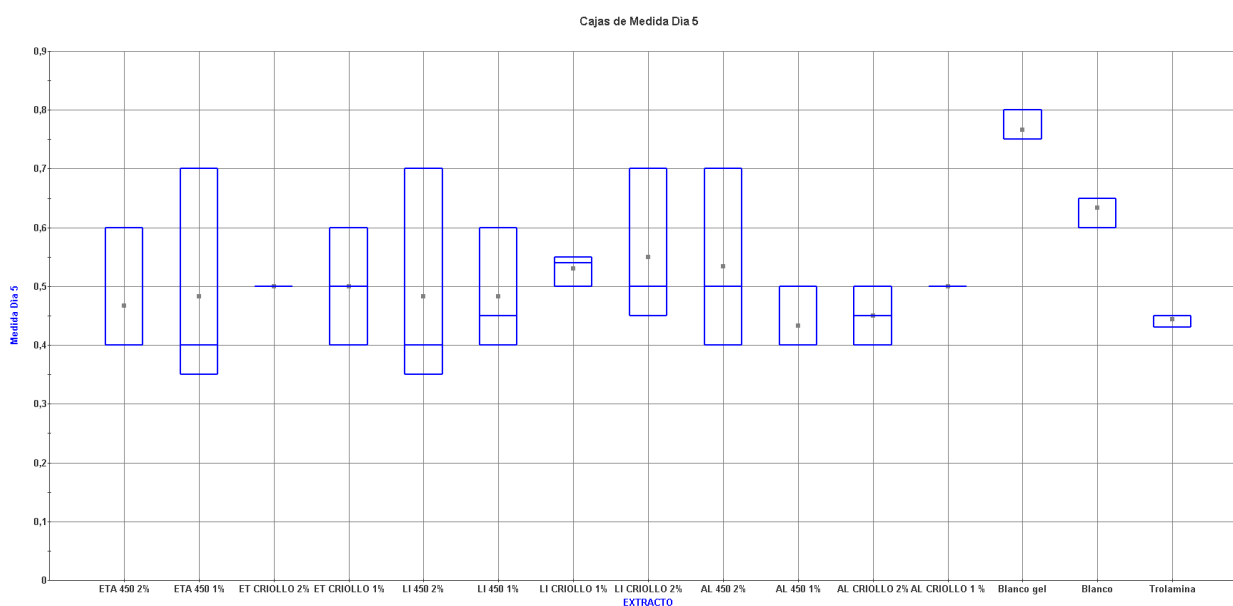
Las varianzas y desviaciones de los grupos de estudio son mínimas con lo cual se mantiene la eficacia del estudio a través de la reproducibilidad y homogeneidad de los datos obtenidos centralizados y sin mayor dispersión entre ellos.

El P-valor calculado es de 0.0436 con lo cual se establece que si existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio para poder determinar

donde se encuentran esas diferencias es necesario ensayar un post estadístico confirmatorio, post-hoc Tukey HSD al 95%.

Donde, se determina que los grupos  $X_a$  alcaloidal 450 al 1% y Trolamina son los de mejor accionar cicatrizante. Seguidos por los restantes grupos  $X_b$  que alcanzan una actividad media de acción cicatrizante y finalmente el de menor actividad cicatrizante  $X_c$  por ser el blanco gel solo excipientes el cual será comparativo para evaluar la mejor actividad cicatrizante.

**GRÁFICO 7: CAJAS DE MEDIAS Y DESVIACIÓN DE ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICO, LIPÍDICO Y ALCALOIDAL DEL CHOCHO 450 Y CRIOLLO (*Lupinus mutabilis Sweet*); DESPUES DE CINCO DÍAS DE SU ADMINISTRACIÓN**



AUTOR: CASTILLO S, 2014

En el grafico se observa que los extractos siguen un mismo comportamiento dentro de un rango de actividad comprendido entre 0.4 y 0.5  $\text{cm}^2$  tan solo dejando por fuera de esta banda de acción al grupo blanco gel solo excipientes que está muy por encima del proceso de cicatrización alcanzado por los demás grupos de estudio.

Los valores de dispersión mínimos alcanzados por cada grupo de estudio se ven reflejados en el tamaño de las cajas de los mismos estableciéndose un comportamiento casi similar entre los grupos con lo cual se establece la reproducibilidad de los datos obtenidos.

**CUADRO 39:** ANÁLISIS ESTADÍSTICO ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICO, LIPÍDICO Y ALCALOIDAL DEL CHOCHO 450 Y CRIOLLO ((*Lupinus mutabilis* Sweet); DESPUES DE OCHO DÍAS DE SU ADMINISTRACIÓN. ANOVA UN FACTOR COMPARACIONES MÚLTIPLES. MÉTODO: TUKEY HSD AL 95.00%.

GRUPOS	ÁREA HERIDA cm <sup>2</sup>	GRUPOS HOMOGÉNEOS
ETA 450 2%	0.466 ± 0.115	X <sub>b</sub>
ETA 450 1%	0.483 ± 0.189	X <sub>b</sub>
ETA CRIOLLO 2%	0.466 ± 0.577	X <sub>b</sub>
ETA CRIOLLO 1%	0.416 ± 0.764	X <sub>b</sub>
LI 450 2%	0.400 ± 0.173	X <sub>b</sub>
LI 450 1%	0.416 ± 0.764	X <sub>b</sub>
LI CRIOLLO 1%	0.400 ± 0.500	X <sub>b</sub>
LI CRIOLLO 2%	0.316 ± 0.076	X <sub>a</sub>
AL 450 2%	0.400 ± 0.100	X <sub>b</sub>
AL 450 1%	0.333 ± 0.057	X <sub>b</sub>
AL CRIOLLO 2%	0.400 ± 0.050	X <sub>b</sub>
AL CRIOLLO 1 %	0.383 ± 0.028	X <sub>b</sub>
BLANCO GEL SOLO EXCI.	0.723 ± 0.025	X <sub>c</sub>
BLANCO SIN NADA	0.616 ± 0.015	X <sub>c</sub>
TROLAMINA	0.313 ± 0.015	X <sub>a</sub>

N= 3, media ± Desviación estándar. p – valor 0. 0003

AUTOR: CASTILLO S, 2014

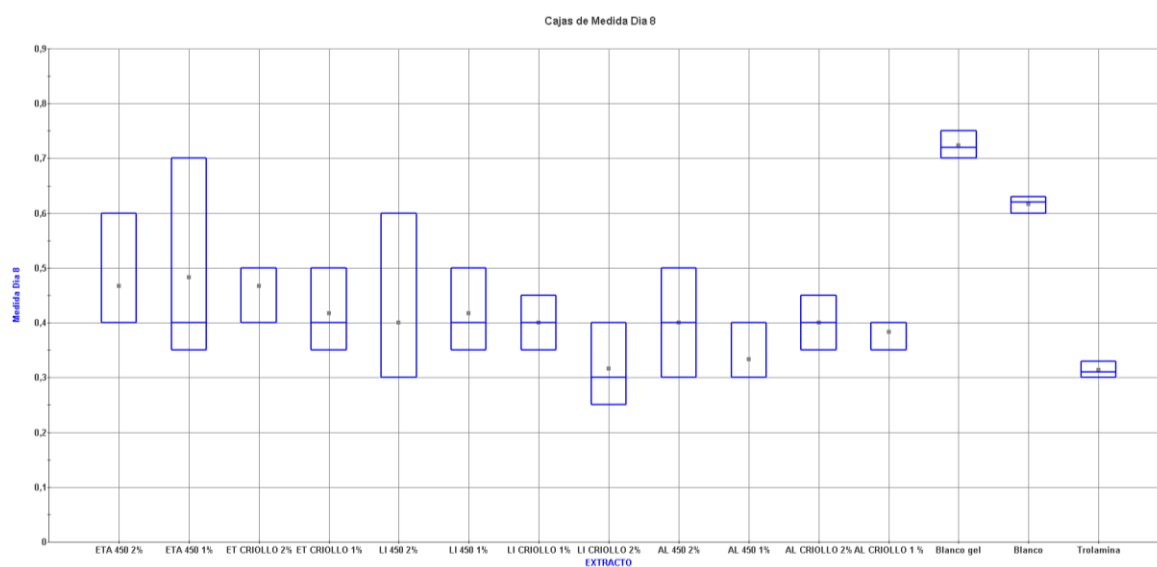
Al octavo día de tratamiento se evidencia que el extracto etanólico 450 al 1 % es el de menor accionar cicatrizante ya que el tamaño promedio de la herida en este grupo es de 0.4833 cm<sup>2</sup>, en tanto que el extracto lipídico criollo al 2% redujo el tamaño promedio de la herida hasta 0.3167cm<sup>2</sup> muy próximo al desempeño de la Trolamina que redujo el tamaño de la herida hasta 0.3133 cm<sup>2</sup>.



El comportamiento del extracto lipídico criollo al 2% prevalece como la mejor opción en cuanto a actividad cicatrizante en este punto de la investigación.

Los valores obtenidos de varianza y desviación siguen siendo mínimos con lo cual se mantiene la eficacia de la investigación a través de la reproducibilidad y homogeneidad de los datos recolectados.

**GRÁFICO 8:** CAJAS DE MEDIAS Y DESVIACIÓN DE ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICO, LIPÍDICO Y ALCALOIDAL DEL CHOCHO 450 Y CRIOLLO (*Lupinus mutabilis Sweet*); DESPUES DE OCHO DÍAS DE SU ADMINISTRACIÓN



AUTOR: CASTILLO S, 2014

Lo más representativo en este grafico es la separación de los grupos blanco control que ya se quedan rezagados en el proceso de cicatrización, en tanto que la Trolamina destaca por ser el grupo guía estandar al ser el de mejor desempeño en la evaluación seguido muy de cerca por el extracto alcaloidal 450 al 1%.

El resto de extractos presentan un comportamiento similar con una actividad cicatrizante media.

El P-valor observado es de 0.0003 marcando claramente la existencia de diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio.

Con el test comprobatorio de Tukey se determinó que se presentan tres grupos homogéneos, grupos alcaloidal 450 al 1% y Trolamina son los de mejor accionar cicatrizante  $X_a$ .

Seguidos por los demás grupos que alcanzan una actividad media de acción cicatrizante  $X_b$  y finalmente el de menor actividad cicatrizante por ser el blanco gel solo excipientes  $X_c$ .

**CUADRO 40:** ANÁLISIS ESTADÍSTICO ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICO, LIPÍDICO Y ALCALOIDAL DEL CHOCHO 450 Y CRIOLLO (*Lupinus mutabilis* Sweet); DESPUES DE ONCE DÍAS DE SU ADMINISTRACIÓN. ANOVA UN FACTOR COMPARACIONES MÚLTIPLES. MÉTODO: TUKEY HSD AL 95.00%.

GRUPOS	ÁREA HERIDA cm <sup>2</sup>	GRUPOS HOMOGÉNEOS
ETA 450 2%	0.350 ± 0.087	X <sub>b</sub>
ETA 450 1%	0.383 ± 0.104	X <sub>c</sub>
ETA CRIOLLO 2%	0.356 ± 0.025	X <sub>b</sub>
ETA CRIOLLO 1%	0.250 ± 0.050	X <sub>b</sub>
LI 450 2%	0.300 ± 0.173	X <sub>b</sub>
LI 450 1%	0.266 ± 0.028	X <sub>b</sub>
LI CRIOLLO 1%	0.260 ± 0.052	X <sub>b</sub>
LI CRIOLLO 2%	0.250 ± 0.050	X <sub>b</sub>
AL 450 2%	0.283 ± 0.028	X <sub>b</sub>
AL 450 1%	0.266 ± 0.076	X <sub>b</sub>
AL CRIOLLO 2%	0.283 ± 0.076	X <sub>b</sub>
AL CRIOLLO 1 %	0.200 ± 0.000	X <sub>a</sub>
BLANCO GEL SOLO EXCI.	0.626 ± 0.025	X <sub>c</sub>
BLANCO SIN NADA	0.610 ± 0.017	X <sub>c</sub>
TROLAMINA	0.213 ± 0.011	X <sub>a</sub>

N= 3, media ± Desviación estándar. p – valor 0. 0006 E-4

AUTOR: CASTILLO S, 2014

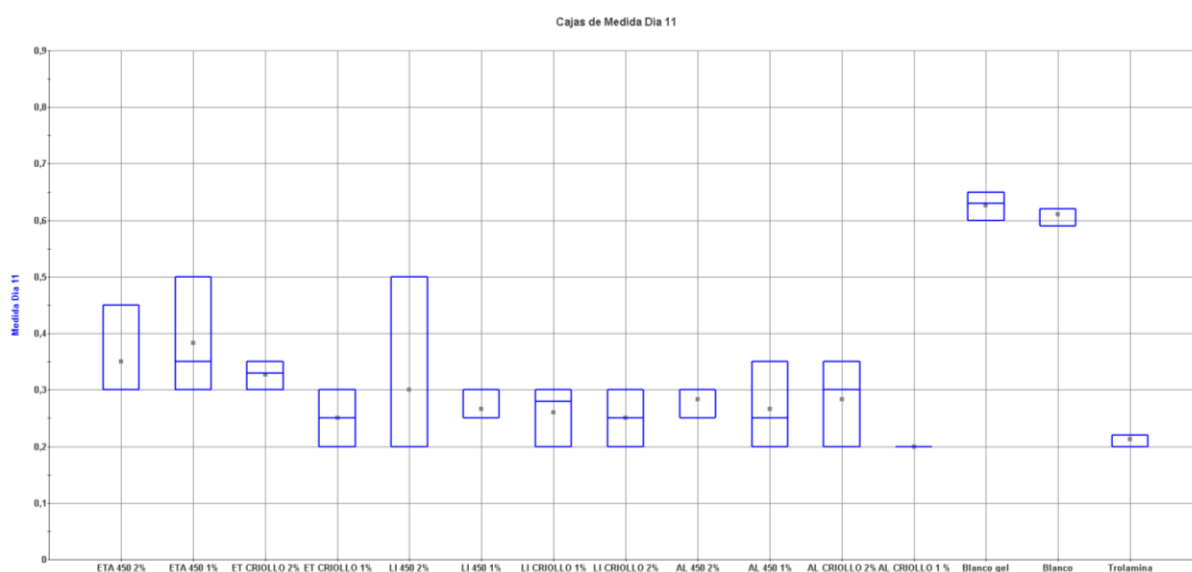
En el onceavo día de tratamiento el extracto etanólico 450 al 1% sigue siendo el de menor actividad cicatrizante, en tanto que en esta ocasión el extracto alcaloidal criollo al 1% disminuyo el tamaño promedio de la herida hasta 0.2000 cm<sup>2</sup> con lo cual supera el desempeño de la Trolamina, cabe indicara que hasta el octavo día el extracto alcaloidal 450 al 1% era el de mejor desempeño pero al momento también presenta un desempeño considerable en la reducción del tamaño de la herida permaneciendo en 0.2667 cm<sup>2</sup>.

Los valores obtenidos de varianza y desviación siguen siendo mínimos con lo cual se mantiene la eficacia de la investigación a través de la reproducibilidad y homogeneidad de los datos recolectados.

El P-valor es de 0.0006E-4 con lo cual se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa estableciendo diferencias estadísticamente significativas en este punto del tratamiento. El extracto alcaloidal criollo al 1% y Trolamina conforman el grupo homogéneo  $X_a$  de mayor actividad cicatrizante seguidos por los demás extractos que presentan actividad media  $X_b$  en relación a los de mejor desempeño.

Finalmente, los grupos blanco  $X_c$  que avanza su proceso de cicatrización en función de la fisiología natural de los animales de experimentación.

**GRÁFICO 9:** CAJAS DE MEDIAS Y DESVIACIÓN DE ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICO, LIPÍDICO Y ALCALOIDAL DEL CHOCHO 450 Y CRIOLLO (*Lupinus mutabilis* Sweet); DESPUES DE ONCE DÍAS DE SU ADMINISTRACIÓN



AUTOR: CASTILLO S, 2014

En el grafico claramente se observa que la Trolamina y extracto alcaloidal criollo al 1 % son los que mejor actividad cicatrizante presentan, dejando al resto de grupos de estudio en un comportamiento medio de actividad cicatrizante en un rango de 2.5 a 4 cm en el tamaño de la herida, sin tomar en cuenta a los grupos blanco que servirán de referencia para comparar el progreso de la investigación.

**CUADRO 41:** ANÁLISIS ESTADÍSTICO ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICO, LIPÍDICO Y ALCALOIDAL DEL CHOCHO 450 Y CRIOLLO (*Lupinus mutabilis* Sweet); DESPUES DE CATORCE DÍAS DE SU ADMINISTRACIÓN. ANOVA UN FACTOR COMPARACIONES MÚLTIPLES. MÉTODO: TUKEY HSD AL 95.00%.

GRUPOS	ÁREA HERIDA cm <sup>2</sup>	GRUPOS HOMOGÉN EOS	% EFICIENCIA CICATRIZACIÓN EN RELACIÓN AL CRIOLLO 1%
ETA 450 2%	0.270 ± 0.165	X <sub>b</sub>	37
ETA 450 1%	0.233 ± 0.153	X <sub>b</sub>	43
ETA CRIOLLO 2%	0.250 ± 0.050	X <sub>b</sub>	40
ETA CRIOLLO 1%	0.200 ± 0.500	X <sub>b</sub>	50
LI 450 2%	0.200 ± 0.173	X <sub>b</sub>	50
LI 450 1%	0.216 ± 0.028	X <sub>b</sub>	45
LI CRIOLLO 1%	0.200 ± 0.087	X <sub>b</sub>	50
LI CRIOLLO 2%	0.200 ± 0.050	X <sub>b</sub>	50
AL 450 2%	0.183 ± 0.077	X <sub>b</sub>	55
AL 450 1%	0.233 ± 0.057	X <sub>b</sub>	43
AL CRIOLLO 2%	0.216 ± 0.057	X <sub>b</sub>	45
AL CRIOLLO 1 %	0.100 ± 0.000	X <sub>a</sub>	100
BLANCO GEL SOLO EXCI.	0.436 ± 0.016	X <sub>c</sub>	22
BLANCO SIN NADA	0.4967 ± 0.006	X <sub>c</sub>	20
TROLAMINA	0.156 ± 0.006	X <sub>a</sub>	62

N= 3, media ± Desviación estándar. p – valor 0. 0005

AUTOR: CASTILLO S, 2014

En el décimo cuarto día de estudio se observa que el extracto etanólico 450 al 2 % es el de menor accionar en relación a la capacidad cicatrizante, En tanto que el extracto alcaloidal criollo al 1 % redujo el tamaño promedio de la herida a 0.1000 cm<sup>2</sup> superando por mucho a la Trolamina que redujo el tamaño promedio de la herida a 0.1567 cm<sup>2</sup>

La reproducibilidad y homogeneidad de los datos recolectados está garantizada en relación a los valores de medida de dispersión que presentan cada grupo sus

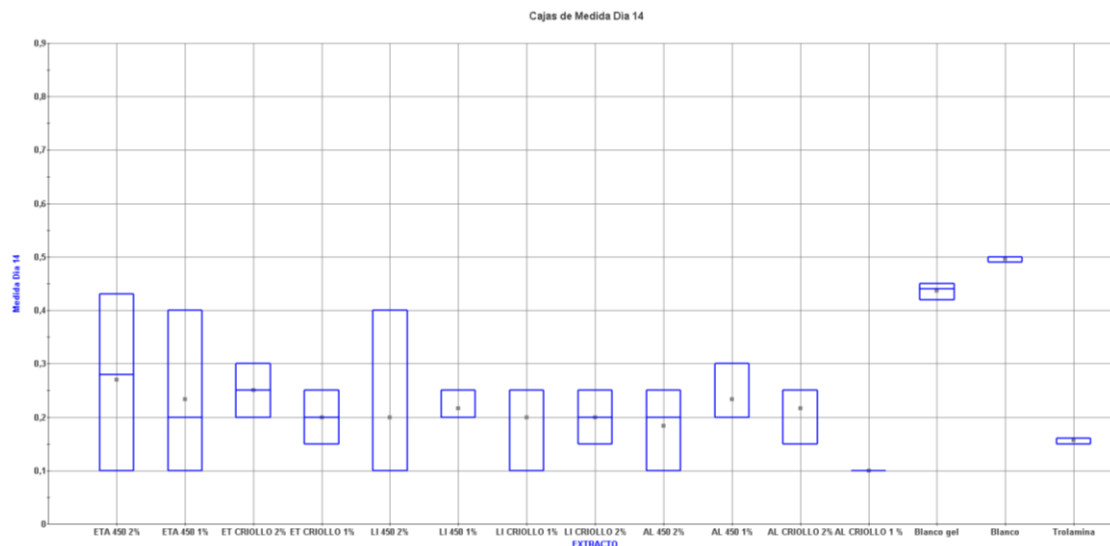
valores de varianza y desviación típica son mínimos con lo cual se respalda la presente investigación.

El P-valor obtenido es de 0.0005 con lo cual se establece diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio. El extracto alcaloidal criollo al 1% y Trolamina confirman un solo grupo homogéneo  $X_a$ , los cuales son los mejores con respecto a la actividad cicatrizante.

Los demás extractos conforman un grupo homogéneo  $X_b$  de actividad media, y finalmente los grupos  $X_c$  blanco avanzan progresivamente su proceso de cicatrización en condiciones naturales muy por debajo de los grupos de estudio.

En cuanto al % Eficiencia de cicatrización de los geles en relación al gel con extracto alcaloidal criollo al 1%, considerado como 100 % de eficiencia; el que le sigue es la Trolamina con un porcentaje de eficiencia del 62 %, seguido del grupo homogéneo  $X_b$  de actividad media con un porcentaje de eficiencia entre 37 % y 55 %. Y finalmente los grupos  $X_c$  blancos avanzan muy por debajo de los grupos de estudio, presentando un porcentaje de eficiencia entre 20 % y 22 %.

**GRÁFICO 10:** CAJAS DE MEDIAS Y DESVIACIÓN DE ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICO, LIPÍDICO Y ALCALOIDAL DEL CHOCHO 450 Y CRIOLLO (*Lupinus mutabilis* Sweet); DESPUES DE CATORCE DÍAS DE SU ADMINISTRACIÓN



AUTOR: CASTILLO S, 2014

Lo más representativo en el grafico es que el extracto alcaloidal criollo al 1% es claramente superior en su actividad cicatrizante en relación a los demás grupos de estudio incluso superando lo obtenido por la Trolamina que es el estándar guía.

**CUADRO 42:** ANÁLISIS ESTADÍSTICO TIEMPO DE CICATRIZACIÓN (DÍAS) DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICO, LIPÍDICO Y ALCALOIDAL DEL CHOCHO 450 Y CRIOLLO (*Lupinus mutabilis Sweet*). . ANOVA UN FACTOR COMPARACIONES MÚLTIPLES. MÉTODO: TUKEY HSD AL 95.00%.

GRUPOS	ÁREA HERIDA cm <sup>2</sup>	GRUPOS HOMOGÉNEOS
ETA 450 2%	12.666 ± 0.577	X <sub>d</sub>
ETA 450 1%	12.000 ± 0.000	X <sub>c</sub>
ETA CRIOLLO 2%	12.333 ± 0.577	X <sub>c</sub>
ETA CRIOLLO 1%	10.333 ± 0.577	X <sub>b</sub>
LI 450 2%	11.000 ± 0.000	X <sub>b</sub>
LI 450 1%	11.666 ± 0.577	X <sub>c</sub>
LI CRIOLLO 1%	10.000 ± 1.000	X <sub>b</sub>
LI CRIOLLO 2%	10.666 ± 0.577	X <sub>b</sub>
AL 450 2%	10.333 ± 0.577	X <sub>b</sub>
AL 450 1%	11.333 ± 0.577	X <sub>b</sub>
AL CRIOLLO 2%	12.000 ± 0.000	X <sub>c</sub>
AL CRIOLLO 1 %	8.000 ± 0.000	X <sub>a</sub>
BLANCO GEL SOLO EXCI.	12.666 ± 0.577	X <sub>d</sub>
BLANCO SIN NADA	13.666 ± 0.577	X <sub>d</sub>
TROLAMINA	8.000 ± 0.000	X <sub>a</sub>

N= 3, media ± Desviación estándar. p – valor 0. 0001 E-9

AUTOR: CASTILLO S, 2014

En el presente cuadro descriptivo se valora el periodo final de cicatrización el extracto etanólico 450 al 2% tardó 12.6667 días en tanto que el extracto alcaloidal criollo al 1% y Trolamina tan solo tardaron 8 días. La varianzas y desviaciones presentan valores mínimos que no influyen sobre la reproducibilidad y homogeneidad de los datos recolectados.

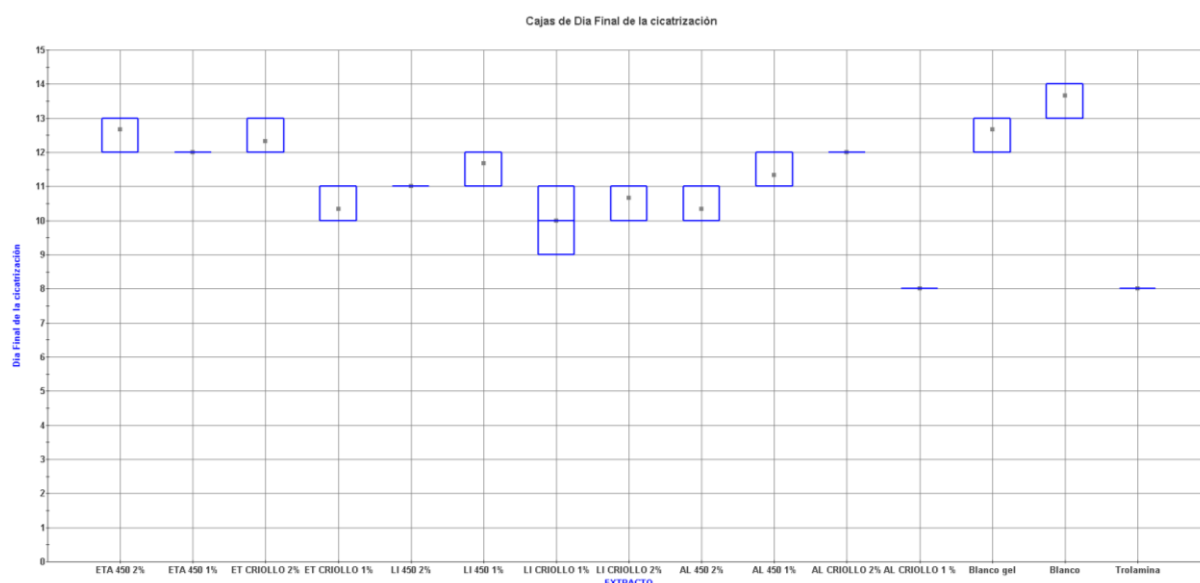
El P-valor observado es de 0.0001E-9 determinándose diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, se puede apreciar cuatro grupos homogéneos: el primero X<sub>a</sub> formado por extracto alcaloidal criollo al 1% junto con la Trolamina que son los de mayor eficacia; seguidos por los grupos X<sub>b</sub> lipídico criollo al 1% , etanólico criollo al 1%, alcaloidal 450 al 2%, lipídico criollo al 2%, lipídico 450 al 2% y alcaloidal 450 al 1% con una media de días entre 10 y 11.



Posteriormente se encuentra un grupo homogéneo  $X_c$  conformado por lipídico 450 al 1%, etanólico 450 al 1%, alcaloidal criollo al 2% y etanólico criollo al 2% alcanzando su media de cicatrización entre 11 y 12 días.

Finalmente tenemos el grupo homogéneo  $X_d$  conformado por etanólico 450 al 2%, blanco gel solo con excipientes y blanco sin nada alcanzando una media de 12 días.

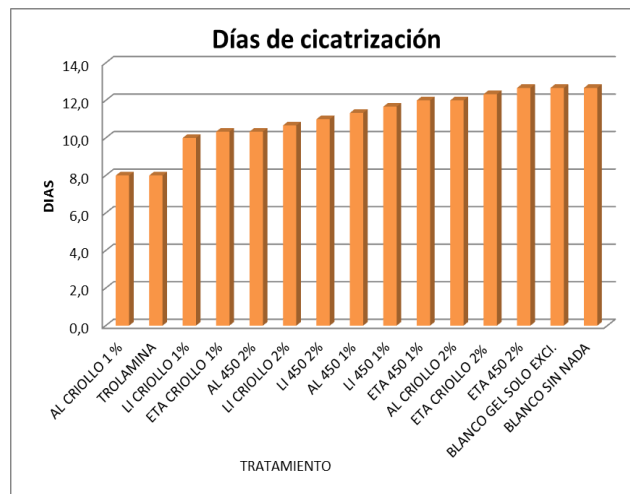
**GRÁFICO 11:** CAJAS DE MEDIAS Y DESVIACIÓN DE ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICO, LIPÍDICO Y ALCALOIDAL DEL CHOCHO 450 Y CRIOLLO (*Lupinus mutabilis* Sweet); DESPUES DE CATORCE DÍAS DE SU ADMINISTRACIÓN



AUTOR: CASTILLO S, 2014

Claramente se evidencia que el gel con extracto alcaloidal criollo al 1% y Trolamina son los de mayor eficacia en corto tiempo en relación a los demás grupos de estudio.

## GRÁFICO 12: DÍAS DE CICATRIZACIÓN



AUTOR: CASTILLO S, 2014

El GRÁFICO 12, corrobora los resultados del GRÁFICO 11, en los cuales se evidencia que el gel con extracto alcaloidal criollo al 1% y Trolamina son los de mayor eficacia en un tiempo de ocho días.

## CUADRO 43: Área bajo la curva de la superficie no cicatrizada a término del periodo de estudio

ÁREA BAJO LA CURVA DE LA SUPERFICIE NO CICATRIZADA A TÉRMINO DEL PERIODO DE ESTUDIO															
	SUERO FISIOLÓGICO	GEL PLACEBO	TROLAMINA	L450 1%	L450 2%	LC 1%	LC 2%	E450 1%	E450 2%	EC 1%	EC 2%	A450 1%	A450 2%	AC 1%	AC 2%
	9,1	8,58	5,275	5,1	8,25	6,3	4,7	8,35	5,42	4,775	6,55	4,9	7	5,3	5,52
	8,855	8,31	5,26	5,375	4,55		5,36	4,925	7,495	6,575	5,95	5,05	5,97	5,15	4,775
	9,16	8,605	5,41	6,875	4,525	5,35	6,925	5,3	5,05	5,7	6,415	6,25	4,925	5,4	6,125
PROMEDIO	9,038	8,498	5,315	5,783	5,775	5,825	5,662	6,192	5,988	5,683	6,305	5,400	5,965	5,283	5,473
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	0,162	0,164	0,083	0,955	2,143	0,672	1,143	1,879	1,318	0,900	0,315	0,740	1,038	0,126	0,676
RSD o %CV	1,787727087	1,924845022	1,554347285	16,5192	37,11601	11,5322	20,18422	30,34001	22,00715	15,8378	4,99226	13,70245	17,393278	2,381651	12,35461

% CV= Coeficiente de variación

AUTOR: CASTILLO S, 2014

**CUADRO 44:** Anova de un factor

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
SUERO				
FISIOLÓGICO	3	27,115	9,038333333	0,02610833
GEL				
PLACEBO	3	25,495	8,498333333	0,02675833
TROLAMINA	3	15,945	5,315	0,006825
L450 1%	3	17,35	5,783333333	0,91270833
L450 2%	3	17,325	5,775	4,594375
LC 1%	2	11,65	5,825	0,45125
LC 2%	3	16,985	5,661666667	1,30590833
E450 1%	3	18,575	6,191666667	3,52895833
E450 2%	3	17,965	5,988333333	1,73675833
EC 1%	3	17,05	5,683333333	0,81020833
EC 2%	3	18,915	6,305	0,099075
A450 1%	3	16,2	5,4	0,5475
A450 2%	3	17,895	5,965	1,076425
AC 1%	3	15,85	5,283333333	0,01583333
AC 2%	3	16,42	5,473333333	0,45725833

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	51,64071	14	3,6886222	3,47975868	0,00220999	2,050003588
Dentro de los grupos	30,74065	29	1,060022414			
Total	82,38136	43				

AUTOR: CASTILLO S, 2014

En el Cuadro 44, se puede observar que el promedio del área bajo la curva de la superficie no cicatrizada del gel con extracto alcaloidal de chocho criollo al 1 % es menor, al promedio del área de la Trolamina.

Por otro lado el análisis de varianza, muestra que el p – valor es menor a 0.05 y que el valor calculado F es mayor a F crítico; indicando que alguno de los tratamientos difiere con los demás en cuanto a la actividad cicatrizante. Por lo que para determinar cuál difiere con respecto a la Trolamina se realizó el Test de Dunnet.

#### CUADRO 45: Análisis mediante Dunnet

Comparison	Difference	q		P value
TROLAMINA vs S. FISIO	-3.723	4.429	**	P<0.01
TROLAMINA vs G.PLACEBO	-3.183	3.787	**	P<0.01
TROLAMINA vs L450 1%	-0.4683	0.5571	ns	P>0.05
TROLAMINA vs L450 2%	-0.4600	0.5472	ns	P>0.05
TROLAMINA vs LC 1%	-0.5100	0.5426	ns	P>0.05
TROLAMINA vs LC 2%	-0.3467	0.4124	ns	P>0.05
TROLAMINA vs E450 1%	-0.8767	1.043	ns	P>0.05
TROLAMINA vs E450 2%	-0.6733	0.8010	ns	P>0.05
TROLAMINA vs EC 1%	-0.3683	0.4382	ns	P>0.05
TROLAMINA vs EC 2%	-0.9900	1.178	ns	P>0.05
TROLAMINA vs A450 1%	-0.08500	0.1011	ns	P>0.05
TROLAMINA vs A450 2%	-0.6500	0.7732	ns	P>0.05
TROLAMINA vs AC 1%	0.03167	0.03767	ns	P>0.05
TROLAMINA vs AC 2%	-0.1583	0.1883	ns	P>0.05

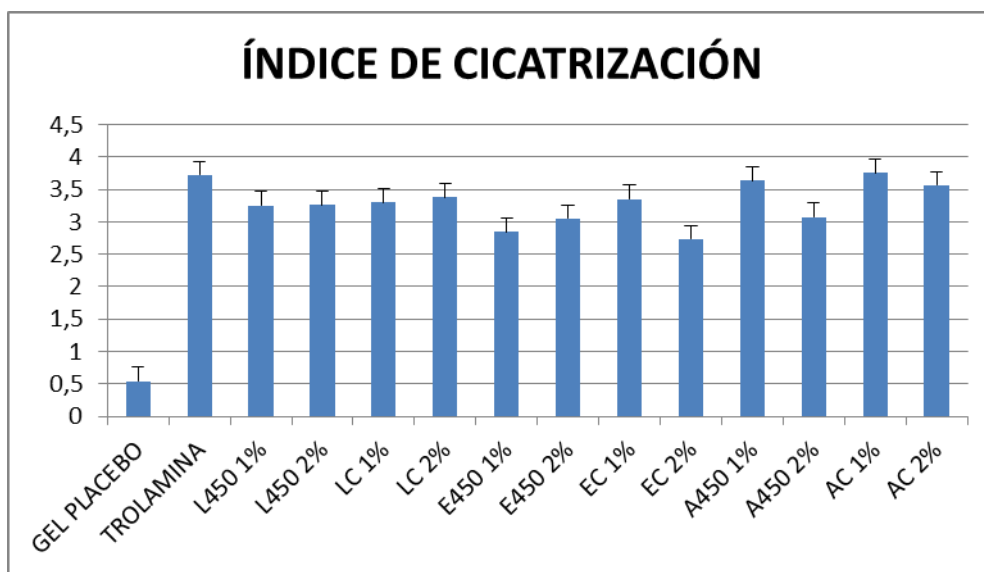
\*\*= muy diferente

ns= no diferencia significativa

AUTOR: CASTILLO S, 2014

Mediante el análisis de Dunnet obtenido con el programa GraphPad InStat, se puede observar que a pesar que no hay diferencia significativa entre la mayoría de grupos, el grupo que tiene el valor de q más pequeño, es el que tiene mayor grado de similitud con la Trolamina y por lo tanto mayor actividad cicatrizante comparado con el resto de grupos. En este caso el gel con extracto alcaloidal de chocho criollo al 1 %.

**GRÁFICO 13: Índice de Cicatrización**



	PLACEBO	TROLA	L450 1%	L450 2%	LC 1%	LC 2%	E450 1%	E450 2%	EC 1%	EC 2%	A450 1%	A450 2%	AC 1%	AC 2%
PROMEDIO	0,54	3,723	3,255	3,2633	3,31	3,377	2,8467	3,05	3,355	2,733	3,63833	3,07333	3,755	3,565

AUTOR: CASTILLO S, 2014

En el GRAFICO 13, se puede observar que el gel Placebo no posee actividad cicatrizante, debido a que el Índice de cicatrización es mínimo comparado con la Trolamina, en cambio el gel Alcaloidal 450 1% y el gel Alcaloidal criollo al 1% son los que tienen mejor actividad cicatrizante ya que el índice de cicatrización es similar a la Trolamina.

### 3.6.2. Evaluación Histopatológica

Los resultados de la evaluación Histopatológica dieron los resultados observados en el CUADRO 46. Indicando que a nivel microscópico, el gel con extracto alcaloidal 1% es el que presenta mayor reepitelización, mayor fibras de colágeno y mayor neo vascularización con presencia de Folículos pilosos a los 14 días. Sin embargo aún existe proceso inflamatorio,

**CUADRO 46:** Evaluación Histopatológica de las muestras de los tejidos epiteliales de ratones (*Mus musculus*), a los 14 días del análisis

Código	Polimorfos nucleares	Linfocitos	Reepitelización	Fibras de Colágeno	Neo vascularización	Folículos y Anexos pilosos
ETA 450 2%	+	++	+++	+++	++	+
ETA 450 1%	++	++	+++	++	+	-
ETA CRIOLLO 2%	++	++	++	+++	+	-
ETA CRI 1%	-	+	+++	+++	++	+
A 450 2%	+	++	+++	+++	++	-
A 450 1%	+	+	+++	+++	+	-
A CRI 2%	-	-	-	-	-	-
A CRI 1%	+	+	+++	+++	+++	++
LI 450 2%	++	++	+++	+++	+	-
LI 450 1%	+	+	+++	+++	+	-
LI CRI 2%	+	++	+++	+++	+++	-
LI CRI1%	+	+	+++	+++	+	+
SUERO	+	+	+++	+++	+++	-
TROLAMINA	++	+	+++	+++	+	++

FUENTE: SOLCA, 2014

**CUADRO 47:** Evaluación Histopatológica de las muestras de los tejidos epiteliales de ratones (*Mus musculus*), a los 21 días del análisis

Código	Polimorfos nucleares	Linfocitos	Reepitelización	Fibras de Colágeno	Neo vascularización	Folículos y Anexos pilosos
ETA 450 2%	-	+	+++	+++	++	-
ETA 450 1%	+	+	+++	+++	+	-
ETA CRI 2%	-	-	-	-	-	-
ETA CRI 1%	-	-	+++	+++	-	+
A 450 2%	-	-	-	-	-	-
A 450 1%	-	-	-	-	-	-
A CRI 2%	+++	+++	+++	+++	++	-
A CRI1%	-	-	+++	+++	+	+
LI 450 2%	-	+	+++	+++	++	-
LI 450 1%	-	-	-	-	-	-
LI CRI 2%	-	-	-	-	-	-
LI CRI 1%	-	-	+++	+++	+	-
SUERO						
TROLAMINA	-	-	+++	+++	-	+

FUENTE: SOLCA, 2014

+++ : Abundante

++ : Moderado

+ : Escaso

En el CUADRO 47 se observa que pasados los 21 días, el tejido epitelial del gel con extracto alcaloidal al 1%, ya no presenta inflamación y la presencia de reepitelización, cantidad de fibras de colágeno, neovascularización y presencia de Folículos pilosos es abundante y en igual proporción que la Trolamina, demostrando un proceso de cicatrización normal (Bielsa, 2006).

Evidenciándose, que el gel con extracto Alcaloidal de Chocho Criollo al 1% posee la mayor actividad cicatrizante en comparación con la Trolamina. Esto se debe a sus propiedades antimicrobianas (De la Vega, 1999), antioxidantes (Tsaliki, E., 1999). y antiinflamatorias (Millán, 2014), las mismas que complementan su efecto cicatrizante.

## CONCLUSIONES

- Mediante los métodos de maceración, extracción con Soxhlet, decocción del grano y una posterior extracción líquido – líquido con éter de, se obtuvieron los extractos etanólicos, lipídicos y alcaloidales respectivamente de las dos variedades de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) 450 Andino y Criollo.
- Mediante tamizaje Fitoquímico, se identificó cualitativamente los metabolitos secundarios de mayor importancia, presentes en los extractos de las dos variedades de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) 450 Andino y Criollo,. Obteniendo como resultado la presencia de alcaloides, taninos, flavonoides y ácidos grasos; los mismos que favorecen el proceso de la cicatrización, gracias a sus propiedades antimicrobianas, astringentes, antisépticas, antioxidantes, protectoras de los vasos sanguíneos, estimulan el sistema inmunológico y favorecen la síntesis de colágeno.
- Los geles de cada variedad de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) a las concentraciones del 2% y 1% con extractos etanólicos, alcaloidales y lipídicos cumplen con las especificaciones de pH, extensibilidad, consistencia, aspecto y parámetros microbiológicos, garantizando la inocuidad de los geles y su aplicabilidad; acorde con la USP 25 y USP 35.
- Posterior a la aplicación de los geles en las heridas producidas en ratones, se pudo comprobar la eficacia de la actividad cicatrizante de todos los geles mediante el seguimiento continuo de los mismos y la aplicación de los test de ANOVA de un factor y un post test TUKEY HSD AL 95%. Evidenciándose el mayor efecto cicatrizante en el gel Alcaloidal de Chocho Criollo al 1% con una medida de la herida igual a  $0.1000\text{ cm}^2$ , comparado con la medida del control positivo Trolamina igual a  $0.1567\text{ cm}^2$ .



## RECOMENDACIONES

- Para el Test de *Artemia salina*, se recomienda como mínimo cinco diluciones para que la variabilidad sea mínima y obtener un intervalo de confianza del 95%; ya que con tan solo tres diluciones el porcentaje de error es muy alto y la confiabilidad se reduce.
- Para depilar el lomo del ratón, es importante realizarlo con crema depilatoria, ya que al usar rasuradora se lastima e irrita la piel, lo que puede provocar resultados erróneos.
- Para la evaluación del efecto cicatrizante de los geles etanólicos, alcaloidales y lipídicos del chocho 450 y chocho Criollo se recomienda que los animales usados para la experimentación estén debidamente separados para evitar que se lastimen entre ellos y modifiquen el tamaño de la herida.
- Realizar un estudio de estabilidad a largo plazo del producto terminado, para así poder estimar su tiempo de vida útil.
- Continuar el estudio experimental pre clínico realizado y proceder a realizar el estudio clínico en pacientes con quemaduras de I Grado; mediante el convenio ya establecido del INIAP con el HOSPITAL PROVINCIAL GENERAL DOCENTE RIOBAMBA.

## BIBLIOGRAFÍA

**ALZUGARAY, D., ALZUGARAY, C.** Enciclopedia de las Plantas Medicinales. Plantas que curan, Sao Paulo - Brasil. 1984, pp. 299.

**ARIAS, L.** Análisis comparativo de dos métodos de aislamiento y determinación de alcaloides de *Lupinus mutabilis*. (Tesis) (Ing. Ind. Alimnt.).Universidad Agraria La Molina, Lima – Perú. 2000, pp. 57-60.

**BIELSA, I.** “Piel normal. Proceso de cicatrización de las Heridas.(Rev. Piel. Servicio de Dermatología. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol), Vol. 21., N° 4. (Barcelona-España), pp. 232-236. Abril 2006  
[http://zl.elsevier.es/es/revista/piel-21/proceso-cicatrizacion-las-heridas-13087174-  
piel-normal-2006](http://zl.elsevier.es/es/revista/piel-21/proceso-cicatrizacion-las-heridas-13087174-piel-normal-2006)  
2014/03/01

**BIOLLEY, E.** “Importancia de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CL) en la alimentación”. (Rev. Chilena de Nutrición), Vol. 38., N° 2. (Santiago- Chile), pp. 113-118. Junio 2007.  
[http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-  
75182011000200012](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182011000200012)  
2014/03/01

**BOBKIEWICZ, T., KOLANOŚ, R., WYSOCKAB, W., &GARCIA , P.** “Hypoglycaemic effect of quinolizidine alkaloids — lupanine and 2-thionosparteine on non-diabetic and streptozotocin-induced diabetic rats”. (European Journal of Pharmacology), Vol. 565., N° 1. (Polonia), pp. 240–244. February 2007  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299907002531>  
2014/03/01

**BROSSI, A.** Alcaloides Química y Farmacología. Barcelona–España. 1987, pp. 23-31.  
<http://es.slideshare.net/anajarquin167/quimica-farmacologia-alcaloides>  
2014/03/01

**BRUNETON, J.** Fitoquímica Plantas Medicinales. 2º ed, Zaragoza- España. Acribia. 2001, pp. 366-367.

**BUSSMANN, W., MALCA, G., GLENN, A., & SHARON, D.** “Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru”. (Journal of Ethnopharmacology), Vol. 137., N° 1. (USA), pp. 121–140. September 2011  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874111003266>  
2014/03/01

**CAICEDO, C., & PERALTA, E.** “Zonificación Potencial, Sistemas de Producción y Procesamiento Artesanal del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) en Ecuador”. (Boletín Técnico INIAP. Programa Nacional de Leguminosas), N° 89. (Quito - Ecuador), pp. 1-18. Enero 2000.

[http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/Zonificacion\\_potencial\\_sistemas\\_produccion\\_procesamiento\\_artesanal\\_chocho\\_Ecuador.pdf](http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/Zonificacion_potencial_sistemas_produccion_procesamiento_artesanal_chocho_Ecuador.pdf)

2014/03/01

**CAMPANA, A.** Efecto del hervido y del lavado, sobre el peso, volumen y contenido de alcaloides en el grano de Tarwi. Lima – Perú. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. 1988, pp.303-305.

**CASANOVA, J., & RIBERA, M.** Enfermedades de la piel. Universidad de Barcelona. Barcelona – España. 2000, pp. 11- 20

<http://www.ladep.es/ficheros/documentos/ENFERMEDADES%20DE%20LA%20PIEL%20ESTUDIOS.pdf>

2014/03/01

**CAÑIGUERAL, S.** Fitoterapia Vademecum de Prescripción. 4º ed, Barcelona-España. Elsevier. 2003, pp. 29-46.

[http://books.google.com.ec/books/about/Fitoterapia.html?id=K3V4p5Pj\\_dAC](http://books.google.com.ec/books/about/Fitoterapia.html?id=K3V4p5Pj_dAC)

2014/03/01

**CAYTUIRO, S.** El chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) nutritivo y medicinal. Puno - Perú. 2010, pp. 2-4

<http://es.scribd.com/doc/201575721/articulo>

2014/03/01

**CHALLEM, J., & BLOCK, M.** Antioxidantes naturales., Madrid – España. Nowtilus. 2008, pp. 69.

<http://www.aglutinaeditores.com/media/resources/public/ff/ff3d/ff3d75f6181a4b01ba98e11ca4b7b312.pdf>

2014/03/01

**CHIRINOS, R., PEDRESCHIB, R. & ROGEZ, H.** “Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medicinal properties from the Peruvian Andean region”. (Journal of Industrial Crops and Products), Vol. 47., N° 1. (Brazil), pp. 145–152. May 2013

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669013001052>

2014/03/01

**CYTED.** Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Manual de Técnicas de Investigación. 1995, pp. 45-50

**DE LA CUBA, A.** “Inhibidores de la Monoaminoxidasa en tratamientos de la depresión”. (Revista de Neuro-Psiquiatría), Vol. 57., Nº 2. (Lima - Perú), pp. 123-128. 1994.

<http://www.upch.edu.pe/famed/revista/index.php/RNP/article/view/1089/1102>

2014/03/01

**DE LA VEGA, R., GUTIERREZA, M., SANZA, C., & CALVOA, R.** “Bactericide-like effect of Lupinus alkaloids”. (Journal of Industrial Crops and Products), Vol. 5., Nº 2. (Madrid - España), pp. 141–148. June 1999

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669096884147>

2014/03/01

**DOMINGUEZ, J.** “Dermatología Popular”. (Revista. Fundación Joaquín Díaz), Vol. 25., Nº 275. (Valladolid - España), pp.171-180. 2003.

<http://www.funjdiaz.net/folklore/07ficha.php?ID=2117>

2014/03/01

**DUHART, K., BUSTOS, E., HERNÁNDEZ, V., & BECERRA, J.** Cuantificación y Caracterización de alcaloides quinolizidínicos. Universidad de Concepción. Chile. 2011

<http://www.brmass.com.br/congresso/resumos/2p1040.pdf>

2014/03/01

**DUPLEX, J., PRASAD, K., TSHIKALANGEC, E., & KUETED, V.** “14 – Alkaloids from the Medicinal Plants of Africa”. (Journal of Pharmacology and Chemistry). Vol.115, Nº 2. (Camerún), pp. 557–605. June 2013

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012405927600014X>

2014/03/01

**FALABELLA, R., JAIRO, V., BARONA, M., & DOMÍNGUEZ, L.** Fundamentos de Medicina: Dermatología. Medellín - Colombia. CIB. 2009, pp. 528.

**FAO.** Guía de campo de los Cultivos Andinos: Tarwi. Lima – Perú. 2007, pp.108-111

<http://www.fao.org/docrep/010/ai185s/ai185s.pdf>

**FRONZA M**, "Determination of the wound healing effect of Calendula extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts". (Journal of Ethnopharmacology). Vol.126, N° 3. (Alemania), pp.463-467. December 2009  
[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleListURL&\\_method=list&\\_ArticleListID=-697052158&\\_sort=r&\\_st=13&\\_view=c&\\_md5=3964477819de635370b02e3eb6259a9c&\\_searchtype=a](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&_ArticleListID=-697052158&_sort=r&_st=13&_view=c&_md5=3964477819de635370b02e3eb6259a9c&_searchtype=a)  
2014/03/01

**GANZERA, M.; KRUGER, A., & WINK, M.** "Determination of quinolizidine alkaloids in different *Lupinus* species by NACE using UV and MS detection". (Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis), Vol.53., N° 5. (Austria), pp. 1231–1235. December 2010.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708510003250>  
2014/03/01

**GARCÍA, J.** Generalidades en Farmacología: Formas Farmacéuticas. Universidad de La Sabana. Bogotá - Colombia. 2012, pp. 60.

**GENNARO, A.** REMINGTON: The Science and Practice of Pharmacy. 20ªed, Buenos Aires – Argentina. Panamericana. 2003, pp. 1409.

**GUSTAVO, G., FONTANARI, J., & PASCHOAL, P.** "Cholesterol-lowering effect of whole lupin (*Lupinus albus*) seed and its protein isolate". (Food Chemistry), Vol.132., N° 3. (São Paulo - Brazil), pp. 1521–1526. June 2012.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611017602>  
2014/03/01

**HAYES, E., PUGSLEY, M., SAINTB, D., & BERLINC, K.** "The cardiac electrophysiological effects of sparteine and its analogue BRB-I-28 in the rat (European Journal of Pharmacology), Vol.294., N° 1. (Canadá), pp. 319–327. December 1995.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/001429999500551X>  
2014/03/01

**INEC.** Folleto de pobreza y desigualdad de los ecuatorianos. Quito - Ecuador. 2012, pp. 5-8.  
[http://inec.gob.ec/inec/index.php?option=com\\_remository&Itemid=420&func=startdown&id=926&lang=es](http://inec.gob.ec/inec/index.php?option=com_remository&Itemid=420&func=startdown&id=926&lang=es)  
2014/03/01

**INIAP.** Usos alternativos del Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). Boletín Técnico N° 333. (Quito - Ecuador). 2006, pp. 9.

**INIAP.** Propiedades y Aplicaciones de los alcaloides del Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). Boletín Técnico N° 133. (Quito - Ecuador). 2011, pp. 6-17.

**INIAP.** Los granos Andinos: Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet), Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), Amaranto (*Amaranthus caudatus* L.) y Sangorache (*Amaranthus quitensis* L.) fuente de metabolitos secundarios y fibra dietética. Boletín Técnico N° 165. (Quito - Ecuador). 2013, pp. 2-16.

**LENA GÁLVEZ, L., GENOVESE, M., & LAJOLO, F.** "Isoflavones and antioxidant capacity of Peruvian and Brazilian lupin cultivars". (Journal of Food Composition and Analysis), Vol.22., N° 5. (España), pp. 397–404. August 2009.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157508001646>  
2014/03/01

**LEÓN, F.** "Evaluation of the wound-healing activity of selected traditional medicinal plants from Peru". (Journal of Ethnopharmacology,). Vol.55, N° 3, (Perú), pp.193-200 February 1997  
[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleListURL&\\_method=list&\\_ArticleListID=697059903&\\_sort=r&\\_st=13&\\_view=c&\\_md5=e6d4d5845bab892e3be7d4a2133f950b&\\_searchtype=a](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&_ArticleListID=697059903&_sort=r&_st=13&_view=c&_md5=e6d4d5845bab892e3be7d4a2133f950b&_searchtype=a)  
2014/03/01

**LOCK DE UGAZ, O.** Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. 2°ed, Lima – Perú. PUCP. 1994, pp. 211-234

**LÓPEZ, T.** "Fitoesteroles Y Fitoestanoles". (Revista Offarm), Vol. 24., N° 4. (Barcelona-España), pp. 212. Abril 2005  
[http://www.elsevier.es/es/revistas/offarm-4/fitoesteroles-fitoestanoles-13073446-ambito\\_farmaceuticofitoterapia-2005](http://www.elsevier.es/es/revistas/offarm-4/fitoesteroles-fitoestanoles-13073446-ambito_farmaceuticofitoterapia-2005)  
2014/03/01

**LOURENÇO, A., MÁXIMO, P., FERREIRA, L. & PEREIRA, M.** "Indolizidine and quinolizidine alkaloids structure and bioactivity". (Journal of Natural Products ), Vol. 27., N° 1. (Caparica, Portugal), pp. 233–298. May 2007  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572599502800382>  
2014/03/01

**MARCANO, D., & HASEGAWA, M.** Fitoquímica Orgánica. 2°ed, Caracas – Venezuela. Publicaciones del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela. 2002, pp. 379 – 401

**MILLÁN, M., BERMÚDEZA, B., & MILLÁNA, F.** “Anti-inflammatory activity of lupine (*Lupinus angustifolius* L.) protein hydrolysates in THP-1-derived macrophages”. (Journal of Functional Foods), Vol. 8., Nº 1. (Sevilla -España), pp. 224–233. May 2014

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464614001182>  
2014/03/01

**MSP.** Preparaciones para el tratamiento de heridas y úlceras. Quito - Ecuador. Cuadro Nacional de Medicamentos Básicos 9na Revisión. 2013, pp. 64

<http://www.conasa.gob.ec/phocadownload/cnmb9na/CNMB9na.REVversionfinal9-X-2013.pdf>  
2014/03/01

**MARTINEZ, M.** Manual de prácticas de laboratorio de Farmacognosia y Productos naturales. La Habana – Cuba. 2000, pp. 38-43

**MUJICA, A., & JACOBSEN, S.** El Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) y sus parientes silvestres. Beisa. La Paz – Bolivia. 2009, pp. 4- 9

<http://www.beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdfer/Capitulo%2028.pdf>  
2014/03/01

**OMS.** Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales. Ginebra – Suiza. 2013, pp. 11-13

[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/95008/1/9789243506098\\_spa.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/95008/1/9789243506098_spa.pdf)  
2014/03/01

**PAMPLONA, J.** Salud por las plantas medicinales. . Madrid – España. Safeliz, pp. 337

<http://books.google.es/books?id=nqPa43luMDcC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>  
2014/03/01

**PÁSTOR, G., VILLACRÉS, E., QUELAL, MB., & ZAMBRANO, I.** “Effect of processing on the content of fatty acids, tocopherols and sterols in the oils of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), lupine (*Lupinus mutabilis* Sweet), amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) and sangorache is (*Amaranthus quitensis* L.)”. (Global Advanced Research Journal of Food Science and Technolog), Vol. 2., Nº 4. (Quito - Ecuador), pp. 44- 53. December 2013.

**PEÑA, A.** Atlas y dermatología del Pie., Buenos Aires – Argentina. Panamericana. 2007, pp.21

[http://books.google.com.ec/books?id=Sji16aQ9XwUC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.ec/books?id=Sji16aQ9XwUC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)

2014/03/01

**PIETERS, L., BRUYNE, I., POEL, B., & VINGERHOETS, R.** “In vivo wound healing activity of Dragon's Blood (Croton spp.), a traditional South American drug, and its constituents”. (Journal of Phytomedicine), Vol.2., Nº 1. (Nueva York - USA), pp. 17-22. July 1995.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711311800437>

2014/03/01

**REPETTO, M., & SANZ, P.** Glosario de términos toxicológicos. (Asociación Española De Toxicología). (Madrid – España), pp. 24. 1995

<http://buscatox.com/05pub/Glosario%20terminos%20toxicologicos%20toxicologia%20Repetto.pdf>

2014/03/01

**RODRÍGUEZ CAVALLINI, E., GAMBOA, M., HERNANDEZ, F., & GARCÍA, J.** Bacteriología General: Principios Y Prácticas de Laboratorio. Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 2005, pp. 57.

<http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=JUIGA.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=000876>

2014/03/01

**RODRÍGUEZ, R., & GONZÁLEZ, H.** “Métodos alternativos para el tratamiento de pacientes con heridas infectadas”. (MEDISAN), Vol.15., Nº 4. (Santiago de Cuba – Cuba), pp. 1. Abril 2011

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1029-30192011000400015&script=sci\\_arttext](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1029-30192011000400015&script=sci_arttext)

2014/03/01

**SÁNCHEZ, R., & MADRID, J.** "Enciclopedia de la Nutrición". Bogotá - Colombia. ESPASA. 2004, pp. 210.

**WILLIAMS, S.** Official Methods of Analysis A.O.A.C, 15<sup>a</sup> ed, USA. 1990.

[http://archive.org/stream/gov.law.aoac.methods.1.1990/aoac.methods.1.1990\\_djvu.txt](http://archive.org/stream/gov.law.aoac.methods.1.1990/aoac.methods.1.1990_djvu.txt)

2014/03/01

**WOLF, GOLDSMITH, KATZ, GILCHREST, PALLER, & LEFFELL.** Desarrollo y estructura de la Piel. 7ª ed, Madrid – España. Panamericana. 2009, pp.57

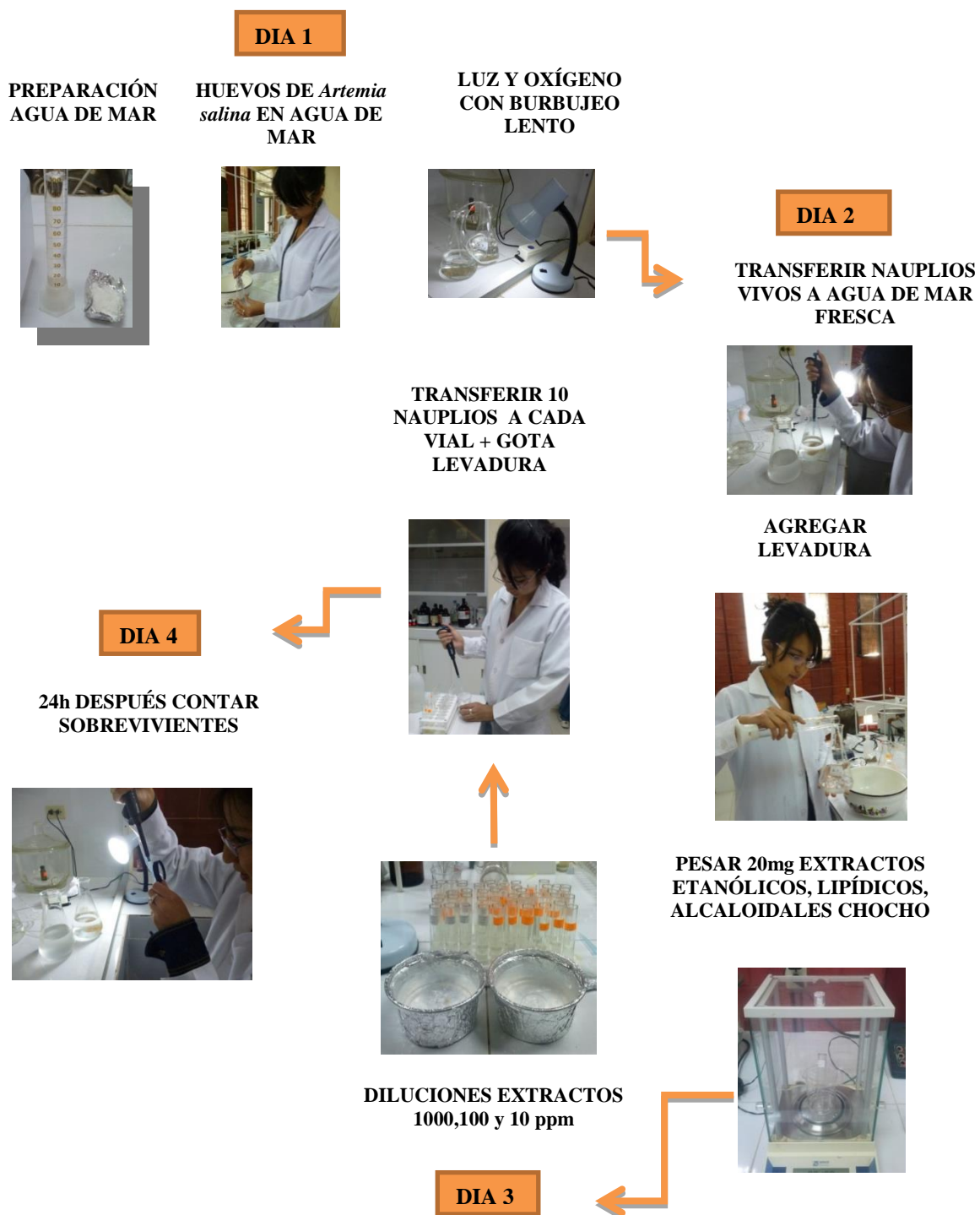
<http://books.google.com.ec/books?id=7VUtAPtt1FH0C&pg=PR.4&dq=WOLF,+G.+Dermatolog%C3%A1+Da+en+Medicina+General.+7%C2%AA+ed&hl=es&sa=X&ei=b4B1VMWuA8GnNvW9hNAB&v&ed=0CCoQ6AEwAQ#v=onepage&q=WOLF%2C%20G.%20Dermatolog%C3%ADa%20en%20Medicina%20General.%207%C2%AA%20ed&f=false>

2014/03/01



## ANEXOS

### ANEXO 1. BIOENSAYO DE TOXICIDAD DEL CHOCHO 450 Y CHOCHO CRIOLLO EN *Artemia salina*



## ANEXO 2. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL 50<sub>(DL50)</sub> DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS, ALCALOIDALES Y LIPÍDICOS DEL CHOCHO 450 Y CHOCHO CRIOLLO

PESAR 13 RATONES (20 – 30 g), CODIFICAR



CLASIFICAR SEGÚN DOSIS:

5000 mg/kg = 3 ratones  
2500mg/kg = 3 ratones  
1250 mg/kg = 3 ratones  
625 mg/kg = 3 ratones

Blanco = 1 ratón



EQUILIBRIO



ETAPA DE AMBIENTACIÓN  
6 DÍAS (con alimento y agua),  
24 h ANTES DE  
ADMINISTRACIÓN DEJAR  
EN AYUNAS

REFLEJO CORNEAL



ACTIVIDAD MOTORA

A LA 1 H DE  
ADMINISTRACIÓN DAR  
ALIMENTO Y EVALUAR  
POR 7 DÍAS, SEGÚN  
PAUTAS DE OBSERVACIÓN



TEST DE CHIMENEA



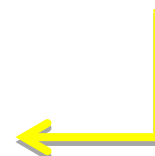
ACTIVIDAD PRENCIL



DÍA DE ADMINISTRACIÓN:  
EXTRACTO DILUIDO EN  
SUERO FISIOLÓGICO

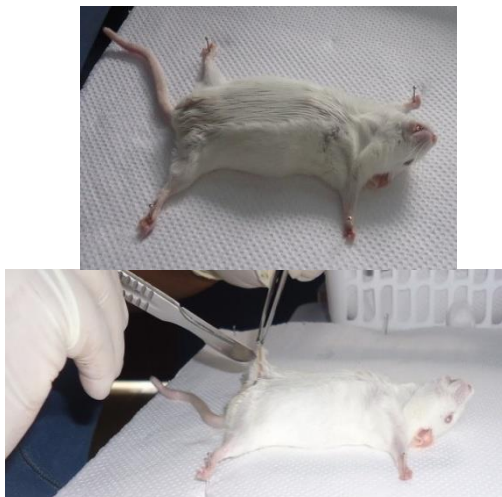


ADMINISTRACIÓN VIA ORAL  
(mL administrados según dosis y pesos)

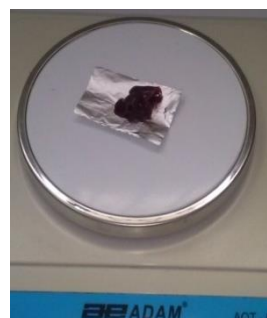


### ANEXO 3. DISECCIÓN Y COMPARACIÓN DE LOS ÓRGANOS DE LOS GRUPOS CON TRATAMIENTO Y LOS ÓRGANOS DEL BLANCO

SACRIFICAR UN RATÓN DE CADA DOSIS ESCOGIDO AL AZAR



EXTRAER LOS ÓRGANOS, PESARLOS Y COMPARARLOS CON EL BLANCO



#### ANEXO 4. ENSAYO DE IRRITABILIDAD DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS, ALCALOIDALES Y LIPÍDICOS DEL CHOCHO 450 Y CHOCHO CRIOLLO

SELECCIONAR 2 RATONES AL AZAR Y  
DEPILAR UNA SECCION DEL LOMO



PASADAS 24 – 48 h APLICAR EL  
EXTRACTO DIRECTAMENTE EN LA  
PIEL

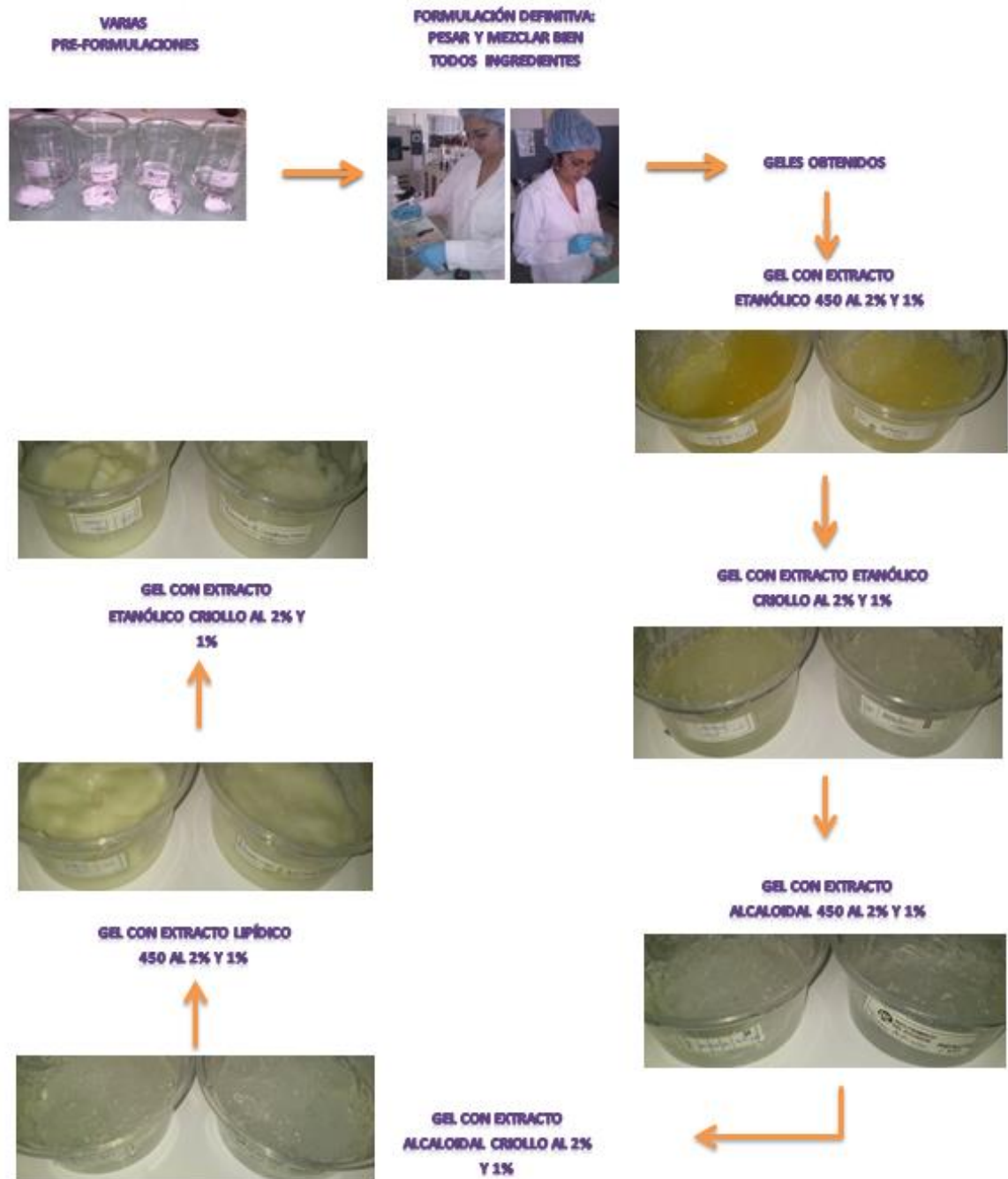


6 h DESPUÉS VOLVER APLICAR  
EXTRACTO (OBSERVAR), 24 h EVALUAR  
LA PIEL



CUBRIR EL ÁREA CON GASA

## ANEXO 5. ELABORACIÓN DE GELES CON EXTRACTOS ETANÓLICOS, ALCALOIDALES Y LIPÍDICOS DE CHOCHO 450 Y CHOCHO CRIOLLO





## ANEXO 6. CONTROL DE CALIDAD DE GELES: CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS Y FÍSICAS DE LOS GELES

CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS:

ASPECTO, COLOR, OLOR

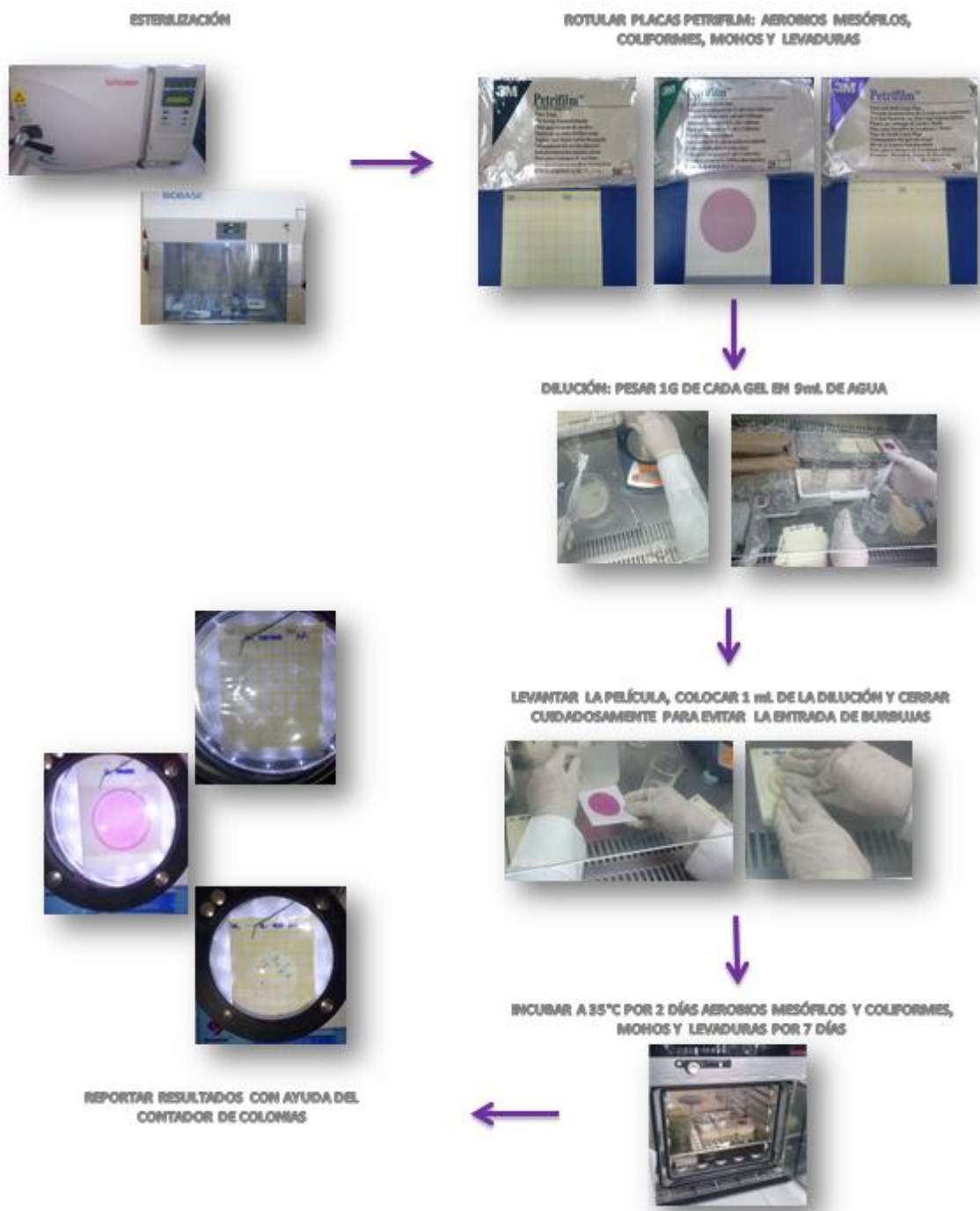


CARACTERÍSTICAS FÍSICAS:

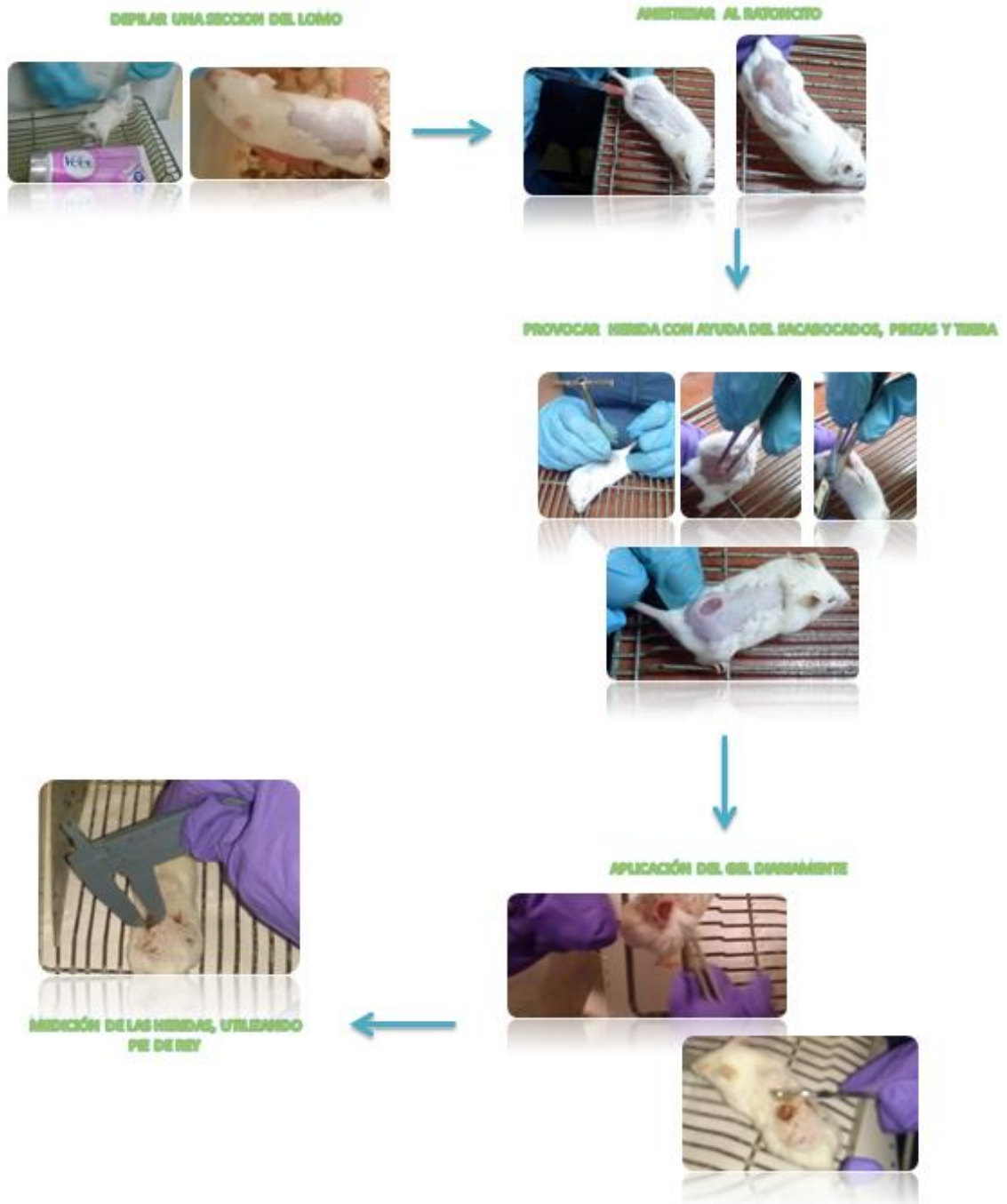
CONSISTENCIA, pH, EXTENSIBILIDAD



## ANEXO 7. CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS GELES: DETERMINACIÓN DE AEROBIOS MESÓFILOS, COLIFORMES, MOHOS Y LEVADURAS EN PLACAS PETRIFILM



## ANEXO 8. ADMINISTRACIÓN VÍA TÓPICA DE LOS GELES Y MEDICIÓN DE LAS HERIDAS





## **ANEXO 9. EVIDENCIA FOTOGRAFÍAS**

**FOTOGRAFÍA 1. Materia prima (Chocho 450 y chocho Criollo)**



**FOTOGRAFÍA 2. Maceración de los extractos**



**FOTOGRAFÍA 3. Filtración y concentración de los Extractos**

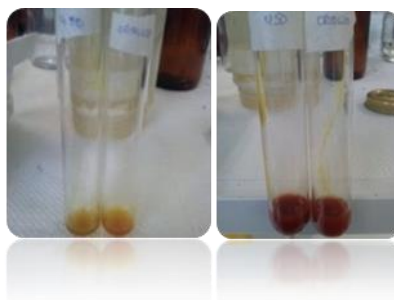


**FOTOGRAFÍA 4. Extractos etanólicos, alcaloidales y lipídicos de las dos variedades de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet): 450 Andino y Criollo**



**FOTOGRAFÍA 5. TAMIZAJE FITOQUÍMICO**

**Ensayo de Dragendorff**



**Ensayo de Borntrager**



**Ensayo de Liebermann-Burchard**



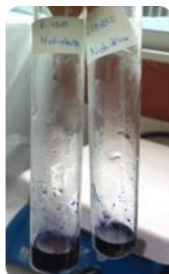
### Ensayo de Fehling



### Ensayo del cloruro férrico



### Ensayo de la Ninhidrina

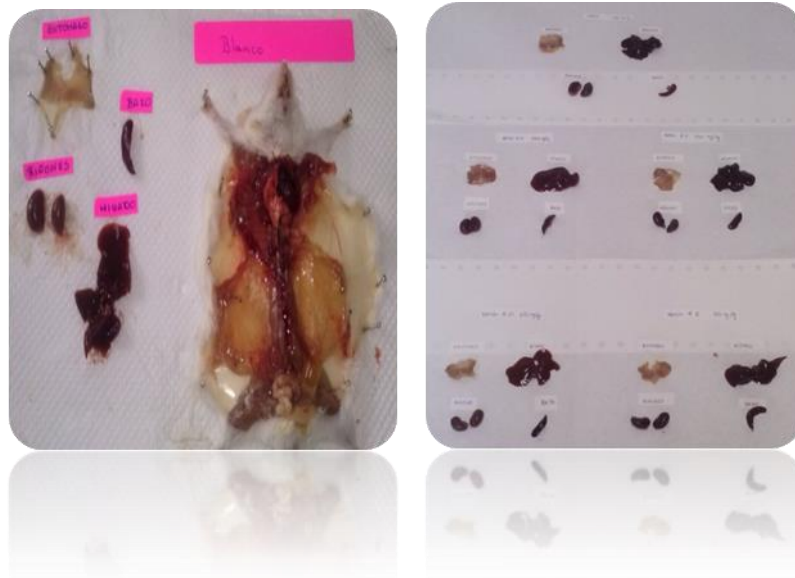


### Ensayo de Shinoda



**FOTOGRAFÍA 6. DISECCION DE VÍSCERAS DE RATONES, APLICADOS  
EXTRACTOS ETANÓLICOS, ALCALOIDES Y LIPÍDICOS DE LAS DOS  
VARIETADES DE CHOCHO**

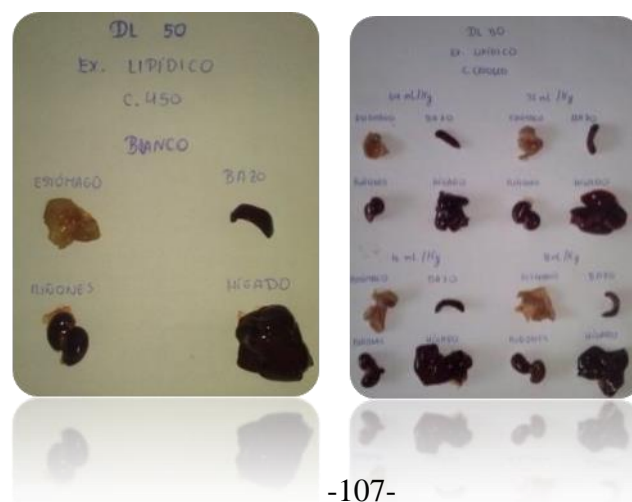
**Extractos Etanólicos**



**Extractos Alcaloidales**



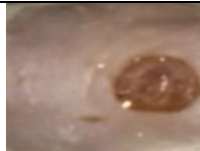


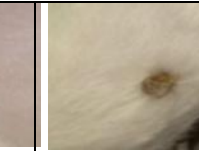
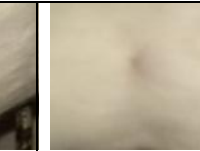







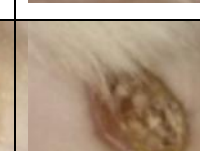





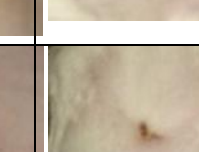

**Extractos Lipídicos**



## FOTOGRAFÍA 7. CICATRIZACIÓN DE LAS HERIDAS

	DIA 3	DIA 5	DIA 8	DIA 11	DIA 14
1. ETA. 450 2%					
2. ETA. 450 1%					
3. ETA. CRI. 2%					
4. ETA. CRI. 1%					
5. LI. 450 2%					
6. LI. 450 1%					
7. LI. CRI. 2%					
8. LI. CRI. 1%					



9. AL. 450 2%					
10. AL. 450 1%					
11. AL. CRI. 2%					
12. AL. CRI. 1%					

**CONTROL NEGATIVO: SUERO FISIOLÓGICO, CONTROL POSITIVO:  
TROLAMINA Y GEL CON EXTRACTO ALCALOIDAL DE CHOCHO  
CRIOLLO 1%**

CICATRIZACIÓN DE LAS HERIDAS					
	DIA 3	DIA 5	DIA 8	DIA 11	DIA 14
<b>BLANCO:</b>  <b>SUERO FISIOLÓGICO</b>					
<b>CONTROL POSITIVO:</b>  <b>TROLAMINA</b>					
<b>GEL CON EXTRACTO ALCALOIDAL DE CHOCHO CRIOLLO 1%</b>					